

Аналитический обзор литературы в области регенеративной медицины, существующих и описанных методов создания тканей и органов, руководств, парадигм и возможностей

Актуальность

Регенеративная медицина является новым этапом в эволюционном развитии медицинских технологий. Данное направление возникло на стыке множества наук и технологий, включая тканевую инженерию, клеточную биологию, молекулярную биологию, гистологию, биологию развития, биохимию, физику, химию, прикладную инженерию и прочие дисциплины, что позволяет назвать данную отрасль медицины воистину первым междисциплинарным видом научно-практической деятельности, использующей самые современные достижения практически каждой научной отрасли. Эта новая дисциплина основана на реальной перспективе регенерации поврежденных тканей и органов *in vivo* (т.е. в живом теле) посредством использования восстановительных технологий и подходов, индуцирующих в прежде нерепарабельных органах процессы самозаживления. Регенеративная медицина также подразумевает выращивание тканей и органов в условиях *in vitro* с последующей пересадкой в тело, неспособное к самостоятельной саморегенерации (Weaver and Carry 2008). Данная революционная технология имеет мощный потенциал для лечения прежде неизлечимых болезней, таких как сахарный диабет, сердечно-сосудистые патологии, хроническая почечная недостаточность, остеопороз и повреждение спинного мозга.

В чем же состоит актуальность регенеративной медицины? Помимо неоспоримых благ для здоровья человека, развитие данной отрасли позволит существенно снизить огромные затраты на здравоохранение при использовании традиционных методов лечения. Например, в США ежегодные затраты на медицинскую помощь превышают 1.5 млрд. долл, что составляет примерно 13% валового национального продукта (US Census Bureau 2000). Ожидается, что в 2040 г. при сохранении традиционных подходов оказания квалифицированной медицинской помощи населению данная сумма расходов может достичь 25% валового национального продукта США (Kopyt et al. 2007; Dall et al. 2009; Kashner et al. 2009; Kolansky et al. 2009). При этом основная часть предполагаемых затрат падет на лечение возрастных заболеваний, развивающихся в результате зависимо от возраста угасания нормальной функции и последующей утраты органов и тканей. Ежегодно в мире на пересадку и искусственное поддержание (замещение) утраченных органов расходуется около 350 млн. долл (8% общемировых затрат на здравоохранение) (Lysaght and Reyes 2001). В США в мае 2010 г. пересадки органов ожидали свыше 107.5 тыс. пациентов при наличии лишь 2220 донорских органов, доступных для трансплантации (OPTN 2010).

Поэтому в целях борьбы с возрастными патологиями, являющимися самыми распространенными заболеваниями современного человечества, в конце 20-го века в экономически развитых странах мира были запущены инновационные программы, направленные на развитие приоритетных исследований и практических разработок по регенеративной медицине. Например, в США действует федеральная инициативная программа по регенеративной медицине (FIRM - Federal Initiative for Regenerative Medicine), нацеленная на получение к 2010 г. коммерчески доступных препаратов кожи, костно-хрящевой ткани и кровеносных сосудов, выращенных искусственным путем, к 2015 г. – разработку наполнителей органов, способных индуцировать репарацию поврежденной ткани, а к 2025 г. – достижение полной регенерации органов (FIRM 2005).

Особую роль в реализации FIRM играет организация в 2005 г. Калифорнийского института регенеративной медицины (California Institute for Regenerative Medicine), получившего государственную поддержку в размере 3 млрд. долл. на 10-летние исследования в области стволовых клеток (СК) (Panetta et al. 2005; Trounson 2009).

Аналогичные приоритетные программы по развитию регенеративной медицины приняты в странах Евросоюза (под эгидой Европейской федерации регенеративной медицины (EFRM), созданной в 2006 г.), Китае и Японии. Если в 2008 г. общая рыночная стоимость разработок и продуктов регенеративной медицины в США и Западной Европе оценивалась в 1.24 млрд. долл. (на долю США приходилось 64%), то к 2013 г. эта цифра должна возрасти втрое (Colleran 2008). Таким образом, приведенные выше факты свидетельствуют о том, что регенеративная медицина представляет собой современную динамично развивающуюся отрасль, которая имеет приоритетную и растущую государственную поддержку в развитых странах в рамках специальных правительственных программ.

На данный момент инженерными методами были созданы следующие органы и ткани:

Орган	Донорский источник и метод децеллюляризации	Тип засеянных клеток	Источник
Трахея	<i>Донорская трахея человека</i> – дезоксирибонуклеаза и дезоксихолат	Аутологичные МСК и эпителиальные клетки	2008, Барселона (Испания), 30-летняя женщина (Macchiarini et al. 2008)
Трахейный лоскут	<i>Свиная тонкая кишка</i> – Механическое удаление, раствор натриевой кислоты, дезоксирибонуклеаза и дезоксихолат	Аутологичные фибробласты и клетки мышцы	2003, Ганновер (Германия), 58-летний мужчина (Biancosino et al. 2006)
Мочевой пузырь	<i>Безклеточный каркас</i>	Аутологичные уротелиальные и мышечные клетки	2000-2005, Винстон-Салем (США), дети в возрасте от 4 до 19 лет (Atala et al. 2006)
Уретра	<i>Безклеточный каркас</i>	Аутологичные эпителиальные и мышечные клетки	2004-2007, Винстон-Салем (США), дети в возрасте от 10 до 14 лет (Atala et al. 2011)
Сосуды (воротная вена)	<i>Донорская воротная вена человека</i>	Не опубликовано	2011, Гётеборг (Швеция), 10-летний ребенок (Michael Olausson et al., not published)
Корень аорты	<i>Донорский корень аорты человека</i> – гипотонический раствор, кислоты и криосохранение	Не засеивался	2002-2003, Рочестер (США), пациенты в возрасте от 31 до 80 года (Zehr et al. 2005)
Сердечный клапан	<i>Пульмональный сердечный клапан человека</i> –	Аутологичные эндотелиальные прогениторные	2002, Кришна (Молдова), 11 и 13-летние дети

	Трипсин/ЕДТК	клетки	(Sebotari et al. 2006)
Кожа и грыжа	<i>Кожа человека</i>	В основном не засеивалась	Балтимор 2000-2005 (Brewer et al. 2011)

В настоящее время регенеративная медицина представляет собой комплексную систему научно-исследовательских, практических и социальных (биоэтических) мероприятий, тесно взаимосвязанных и взаимодействующих друг с другом. В научно-исследовательской и прикладной областях приоритетными задачами регенеративной медицины являются создание новых медицинских устройств и искусственных органов (бионика), тканевая инженерия, клеточная терапия, разработка новых биоматериалов и развитие трансляционной медицины для быстреего внедрения прогрессивных регенеративных технологий в клиническую практику (Fodor 2003).

Клеточная терапия

Терапия с использованием СК основана на концепции замены разрушенных клеток тела новыми путем пересадки с тем, чтобы осуществить более эффективное лечение болезни. В регенеративной клеточной терапии используются эмбриональные и зрелые СК, поскольку те и другие обладают необходимым пролиферативным и, следовательно, регенеративным потенциалом. Пролиферативный потенциал эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) существенно выше, чем у СК взрослого организма. Однако чрезмерные плюрипотентность и пролиферативная способность ЭСК требуют тщательного контроля поведения импланта после пересадки из-за повышенной иммуногенности и потенциальной канцерогенности этих клеток (Henon 2003). Современные биоинженерные подходы позволяют существенно поднять регенеративную способность взрослых СК, что позволило найти широкое применение данным клеткам при лечении таких возрастных заболеваний как диабет, инсульт, хроническая почечная недостаточность, инфаркт миокарда и нейродегенеративные патологии.

Удаление дефектных клеток

Хотя клеточная терапия главным образом сфокусирована на пересадке новых клеток взамен утраченных, немаловажную роль играет также борьба с дефектными и видоизмененными клетками организма. Такие клетки, как правило, возникают при аутоиммунных и раковых заболеваниях.

Опухолевые СК являются основной причиной устойчивости многих видов рака к химиотерапии. Раковые СК отличаются крайней онкогенностью и способностью к метастазообразованию. Поскольку раковые СК экспрессируют специфические клеточные биомаркеры, отличающие их от нормальных СК, важно использовать эти биомаркеры для развития антираковых терапий, специфически направленных для уничтожения только раковых клеток и не затрагивающих при этом здоровых клеток больного (Ciavarella et al. 2010). Например, показано, что ростовой фактор стволовых клеток SCF и его рецептор c-kit (CD117) играют важнейшую роль в выживании и размножении СК рака легких (Gorelik et al. 2010). Использование моноклональных анти-SCF антител в комбинации с иматинибом (ингибитором рецептора CD117) приводила к блокированию SCF/c-kit-зависимому сигнальному пути и специфической элиминации стволовых и прочих клеток рака легких (Levina et al. 2010).

Основными мишенями современных препаратов антираковой терапии являются инактивация ростовых факторов и их рецепторов на опухолевых клетках, ингибирование сигнальных путей, регулируемых онкогенными тирозиновыми протеинкиназами, а также супрессия молекул, контролирующими специфические функции раковых клеток (Ciavarella et al. 2010). Очень эффективным молекулярным оружием против раковых клеток является использование «суицидной терапии», заключающейся в специфической и высокоточной доставке цитотоксических агентов к раковым клеткам,

что приводит к гибели последних при сохранении толерантности по отношению к нераковым клеткам организма больного. Удачным примером успешного применения подобной антираковой терапии может служить использование в составе генно-инженерной конструкции интронного рибозима типа 1 реснитчатой инфузории рода *Tetrahymena*, способного осуществлять специфическую инактивацию онкогенного транскрипта и заменять его на мРНК, кодирующую токсический для раковой клетки продукт (например, тимидинкиназу герпесвируса или дифтерийный токсин А) (Jung et al. 2005; Song and Lee 2006). Для переноса антираковых агентов также разработаны разнообразные подходы с использованием биodeградируемых наночастиц из окиси железа, полимеров, дендримеров и липосом, способные к избирательной доставке высококонцентрированного пула противоракового лекарства (Sajja et al. 2009).

Аналогичные подходы могут быть использованы для удаления клонов аутореактивных Т- и В-клеток, размножающихся и циркулирующих в крови у больных аутоиммунными патологиями. Здесь потенциальную роль может иметь пересадка в организм больного регуляторных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов, играющих ключевую роль в сохранении периферийной иммуно толерантности к аутоантигенам и супрессированию аутоиммунных реакций (Askenasy et al. 2008). Эти клетки резко уменьшаются в числе либо практически исчезают при аутоиммунных заболеваниях. Показано, что регуляторные Т-лимфоциты способны специфически супрессировать клоны аутореактивных Т-клеток, не убивая их подобно цитотоксическим Т-лимфоцитам, а с использованием неизвестного механизма при непосредственном контакте с клеткой-мишенью (Chang X. et al. 2009). Напротив, при раковых заболеваниях (неходжкинские лимфомы Т-клеток и других) регуляторные Т-клетки часто функционируют «неправильно», что приводит не к индукции иммунного ответа против раковых антигенов, а наоборот, к обострению воспалительных и иных иммунных реакций, направленных против организма хозяина и способствующих экспансии раковых клеток (Ruter et al. 2009). Такие «ненормальные» регуляторные Т-клетки являются мишенью для «суицидной терапии» с использованием недавно разработанного иммунотоксического агента Ontak, представляющего собой рекомбинантный гибридный белок, который состоит из фрагментов дифтерийного токсина и человеческого интерлейкина-2 и убивает Т-клетки после связывания на их поверхности с рецептором к интерлейкину-2 (Manoukian and Hagemeister 2009).

Источники стволовых и нестволовых клеток, используемых в клеточной терапии

Как уже упоминалось, трансплантация новых клеток является основным направлением развития клеточной терапии. Для пересадки наряду с СК могут быть использованы и клетки-предшественники, хотя возможности последних к самообновлению существенно ограничены.

Тело взрослого человека состоит из более чем 200 различных типов клеток. ЭСК, способные образовывать все типы клеток взрослого организма, являются плюрипотентными. Если клетки вдобавок способны к формированию внезародышевых тканей, то они называются тотипотентными. К мультипотентным относят клетки, которые могут формировать все типы клеток какой-либо ткани. В том случае, если ткань состоит из одной дифференцированной линии клеток, то СК, отвечающие за возобновление этой линии, являются унипотентными (Watt and Driskell 2010).

Плюрипотентные эмбриональные СК, используемые для регенеративных целей, получают из внутренней клеточной массы бластоцитарных зародышей мышей и человека.

ЭСК мыши были впервые культивированы в 1981 г. (Evans and Kaufman 1981), а человеческие – в 1998 г. (Thomson et al. 1998). Плюрипотентные ЭСК могут быть получены также на более поздних этапах развития зародыша – из эпибластов (Tesar et al. 2007) и примордиальных зародышевых клеток, являющихся предшественниками половых

клеток (Kerr et al. 2006). ЭСК, полученные из зародыша, сохраняют в виде культур недифференцированных клеток.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), первоначально обнаруженные в строме костного мозга (Friedenstein et al. 1987) были затем найдены и в других органах, включая плаценту, пуповину, печень и жировую ткань (Campanoli et al. 2001). Недавние исследования показали, что МСК распространены повсеместно, поскольку в качестве периваскулярных клеток (пероцитов) являются интегральным клеточным компонентом эндотелия (Crisan et al. 2008). МСК не несут типичных поверхностных маркеров гемопоэтических линий клеток (антигены CD14, CD34 и CD45) и позитивны по CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 и Stro-1 (Dominici et al. 2006).

МСК обладают существенной плюрипотентностью и способны дифференцировать в мезодермальные клеточные популяции, из которых в ходе эмбрионального развития образуются костно-хрящевая ткань, строма костного мозга, мышцы, жировая ткань и сухожилия (Pittenger et al. 1999). Кроме того, показана способность МСК дифференцировать в клетки немезодермального происхождения – нейроны, астроциты и гепатоциты (Lee et al. 2004). Другим преимуществом данных СК, объясняющим их широкое применение в клеточной терапии, является очень низкая иммуногенность, что обеспечивает возможность пересадки клеток от практически любого неродственного донора практически любому реципиенту без использования иммуносупрессивной терапии (Le Blanc 2003). Кроме того, МСК обладают иммуносупрессивными свойствами против Т-клеток (Beuth et al. 2005), что делает эти клетки эффективными терапевтическими агентами при лечении больных с остро выраженной реакцией отторжения трансплантированной ткани по причине тканевой несовместимости (Rindgen et al. 2006). Благодаря вышеперечисленным свойствам, МСК нашли применение в клеточной терапии широкого круга патологий, включая сердечно-сосудистые заболевания, инсульт, остеоартрит, несовершенный остеогенез и фиброз печени (Parekkadan and Milwid, in press).

На животных моделях показана способность МСК дифференцироваться в незрелые нервные клетки (Ross and Verfaillie 2008), мигрировать в поврежденные участки нервной ткани и участвовать в их заживлении (Mahmood et al. 2002), что делает данные клетки очень перспективным ресурсом для терапии заболеваний центральной нервной системы и раневых повреждений мозга. Зрелые нервные стволовые клетки, которые участвуют в возобновлении нейронов, астроцитов и олигодендритов, обнаружены в определенных отделах переднего головного мозга (Roy et al. 2000) и представляют потенциальный интерес для использования в регенеративной медицине. Однако их современное клиническое применение пока ограничено из-за трудностей получения в достаточных количествах.

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и клетки-предшественники являются наиболее полно охарактеризованными СК взрослого организма. Они находятся в костном мозге и отвечают за непрерывное обновление клеток крови и иммунной системы. Ранние ГСК человека характеризуются фенотипом CD34+CD90+ или CD34+ CD38- (Weissman and Shizuru 2008). Исключительно полезным свойством ГСК является их способность восстанавливать все клеточные линии крови. ГСК являются первым типом стволовых клеток, использованных в клеточной терапии (Perry and Linch 1996), и ныне широко применяются при трансплантации костного мозга для лечения лейкозий, апластических анемий, первичных и комбинированных иммунодефицитов (Appelbaum 2003).

Эндотелиальные клетки-предшественники (ЭКП) были открыты в 1997 г. (Asahara et al. 1997). Число циркулирующих ЭКП в кровяном русле очень невелико, но при необходимости может существенно возрасти под действием гемопоэтических факторов роста таких как фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов (G-CSF) (Fadini et al. 2006). Подобно МСК и ГСК, ЭКП можно выделить из костного мозга. Главными поверхностными маркерами ЭКП являются поверхностный гликопротеин-антиген CD34,

Flk-1 (рецептор фактора роста сосудистого эпителия – VEGF), CD31 (адгезивная молекула-1 тромбоцитов и клеток эндотелия – PECAM-1), CD133 (проминин-1) и CD144 (кадерин сосудистого эндотелия) (Asahara et al. 1997; Yoder et al. 2007). Общеизвестно, что ЭПК участвуют в развитии сосудов (ангиогенезе), сосудодообразовании (неоваскуляризации), восстановлении сосудистого эндотелия и регуляции эндотелиального гомеостаза (Werner and Nickenig 2006). Трансплантация данных клеток приводит к образованию новых сосудов (Kawamoto et al. 2002), а также улучшает регенерацию сердечной мышцы после перенесенного инфаркта миокарда (Katristsis et al. 2005).

Для репарации и регенерации сердечно-сосудистой системы большой потенциал имеет использование нестволовых клеток крови – макрофагов и моноцитов, в особенности тех, которые экспрессируют поверхностный рецептор Tie-2, служащий рецептором для факторов роста сосудов (ангиопоэтинов) (Murdoch et al. 2007). Изучение свойств Tie-2+ макрофагов и моноцитов, внесенных в Matrigel (биоинженерную базальную мембрану сосудов) показало положительное влияние этих клеток на ремоделирование межклеточного матрикса и сосудодообразование (Anghelina et al. 2004).

Оптимизация культивирования и очистки МСК

В настоящее время проводятся интенсивные разработки по оптимизации процессов культивирования и очистки СК с целью увеличения выхода и улучшения регенеративных свойств данных клеток. Современные условия культивирования МСК и иных типов СК с целью повышения биологической безопасности подразумевают предпочтительное использование бессывороточной среды, не содержащей потенциально иммуногенных белковых добавок животного происхождения (бычий сывороточный альбумин и т.д) (Reinisch and Strunk 2009). В качестве альтернатив питательным средам с животными добавками для культивирования МСК внедрены среды, содержащие человеческую сыворотку и/или активированные тромбином лизаты тромбоцитов человека (Bieback et al. 2009). Показано, что использование таких сред не только увеличивает продукцию МСК, но и улучшает их регенеративные свойства и пролиферативный потенциал (Jung et al. 2009). Технология выращивания МСК адипозной ткани в матриксе, состоящем из денатурированного коллагена типа I, позволяет успешно сохранить адипогенный потенциал культивируемых клеток и достичь клеточной плотности, достаточной для последующей пересадки с целью регенерации адипозной ткани (Mauney et al. 2005).

Для очистки МСК традиционно используют их способность избирательно прикрепляться к пластиковой подложке. Для характеристики фенотипа полученных препаратов МСК обычно используют проточную цитометрию для анализа экспрессии поверхностных биомаркеров. Отсутствие специфических маркеров МСК до недавнего времени затрудняло контроль гомогенности изолированных культур данных клеток. Обнаружение МСК-специфичного поверхностного маркера CD271 (рецептор фактора роста нервов) позволило разработать новые методики, повышающие качество очистки препаратов МСК (Ishimura et al. 2008). Например, использование иммуномагнитных сортеров с иммобилизованными моноклональными антителами против антигена CD271 приводит к получению из исходных клеточных культур практически гомогенных фракций МСК, позитивных по CD271 и негативных по гемопоэтическим поверхностным маркерам (Poloni et al. 2009). К настоящему моменту придумано и разработано достаточно технологических усовершенствований, улучшающих культивирование и выделение МСК (Gnecchi and Melo 2009).

Репрограммирование клеток

Открытая недавно способность зрелых соматических клеток к индукции плюрипотентности в присутствии факторов перепрограммирования имеет большие перспективы для клеточной терапии. Обработка обычных мышечных фибробластов коктейлем из нескольких транскрипционных факторов (Oct4, Sox2, Nanog), отвечающих за сохранение плюрипотентности ЭСК, привела к получению так называемых индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), идентичных по свойствам ЭСК (Takanashi and Yamanaka 2006; Wernig et al. 2007; Maherali et al. 2007). В дальнейшем аналогичные результаты были получены для первичных фибробластов человека (Yu et al. 2007; Takanashi et al. 2007) и нефибробластных клеток мышей – нервных стволовых клеток (Kim JB et al. 2008), В-лимфоцитов (Hanna et al. 2008), гепатоцитов (Aoi et al. 2008) и ряда других.

В первых экспериментах по репрограммированию использовали протоонкогенные факторы (Stat3, c-Myc, Klf4), которые также способны поддерживать плюрипотентный статус ЭСК, но в дальнейшем от них намерены отказаться ввиду их потенциальной онкогенности (Shi et al. 2009). В современных опытах по репрограммированию также прослеживается тенденция по отказу от потенциально опасных ретровирусных и лентивирусных векторов, интегрирующих факторы репрограммирования в геномную ДНК, и переход на использование аденовирусных векторов, способных поддерживать экспрессию трансгена в неинтегрированном (эписомальном) состоянии (Stadtfield et al. 2008). Разработаны генно-инженерные конструкции для удаления вируссодержащих эписом и невирусные полицистронные вектора с последующей элиминацией репрограммирующих факторов после запуска механизма репрограммирования (Okita et al. 2008; Kaji et al. 2009; Yu et al. 2009) с целью повышения биобезопасности и невирулентности ИПСК. Вероятно, одним из самых безопасных методов на сегодняшний день является репрограммирование клеток за счет введения в них мРНК. Такой способ существенно увеличивает безопасность и эффективность репрограммирования (Warren et al. 2010).

Репрограммирование соматических клеток в ИПСК представляет собой вполне конкурентноспособную альтернативу использованию ЭСК ввиду всеобщей доступности исходного клеточного материала и возможности программирования свойств и фенотипа ИПСК в зависимости от конкретных задач клеточной терапии. ИПСК могут быть успешно использованы как в трансплантационной терапии, так и в других практических приложениях, включая получение клеточных моделей заболеваний человека, разработку и доклинические испытания новых лекарств (Romano 2008). Большой регенеративный потенциал ИПСК человека показан на гуманизированных животных моделях сепровидноклеточной анемии (Hanna et al. 2007), болезни Паркинсона (Wernig et al. 2008) и возрастной макулярной дистрофии (Carr et al. 2009). Кроме того, существует реальная перспектива получения индивидуальных ИПСК (т.е. специфических для какого-либо индивида) с целью проведения генетической коррекции наследственных заболеваний.

Подобные эксперименты недавно проведены с фибробластами и кератиноцитами кожи

больного, страдающего анемией Фанкони из-за мутации в гене FANCA (Raya et al. 2009), и клетками крови носителя соматической мутации V617F в гене сигнальной протеинкиназы JAK2, вызвавшей лимфопролиферативное заболевание (Ye et al. 2009). ИПСК, полученные в результате репрограммирования исходных клеток пациентов, имели нормальный фенотип, кариотип и плюрипотентность.

Тканевая инженерия

Тканевая инженерия ориентирована на создание биоинженерных органов и тканей, состоящих из совокупности СК в составе искусственного каркаса и предназначенных для пересадки с целью замещения биологических функций утраченного органа или пораженного участка ткани. Кроме того, данная технология направлена на

разработку эффективных стратегий трансплантации, достижения максимальной гистосовместимости, нетоксичности и полной деградации (рассасывания) искусственных компонентов имплантов после пересадки (Bonassar and Vacanti 1998).

Биоматериалы в тканевой инженерии

Источником клеток в тканевой инженерии служит кровь и твердые ткани. В твердых тканях в результате обработки протеолитическими ферментами (коллагеназа, трипсин и т.д.) удаляют межклеточный матрикс, после чего клетки экстрагируют путем центрифугирования или сепарации. Для создания тканеинженерных биоматериалов используются эмбриональные и взрослые СК различного происхождения: аутологичные (т.е. взятые у того же организма, которому будут пересажены), изогенные (т.е. изолированные из генетически идентичных донора и реципиента – близнецов, клонов), аллогенные (клетки донора и реципиента относятся к одному виду) и ксеногенные (клетки разных видов).

Для создания каркасов используют природные и искусственные материалы. Натуральные каркасы ксеногенного происхождения (соединительная ткань млекопитающих) освобождают от клеток в процессе децеллюляризации с использованием мягких детергентов (например, дезоксихолиновой кислоты) для максимального предохранения соединительнотканного матрикса (Teebken et al. 2009). В качестве природных каркасов чаще применяют различные природные полимеры, включая хитозан, шелк, фибрин, спонгин (Green et al. 2003; Shaikh et al. 2008). При этом в последнее время хитозану и его производным отдают все большее предпочтение ввиду его повышенной биосовместимости, биodeградебельности, способности к легкой химической модификации, высокому сродству к макромолекулам, антибактериальным и заживляющим свойствам, а также наличию пор и способности инициировать гелеобразование (Kim IY et al. 2008).

Широкое применение в тканевой инженерии также нашли различные искусственные полимерные материалы, одним из неоспоримых достоинств которых является возможность получения из них наночастиц, размер и структура которых имитирует нанотопографию природного внеклеточного матрикса, что позволяет копировать естественные свойства соединительной, хрящевой, зубной и костной ткани (Venugopal et al. 2010). Такой подход используется для создания искусственных полимерных нанофибрилл размером 5-500 нм, имитирующих свойства коллагеновых фибрилл сухожилий, получения наносфер из гидроксипатита с полимерными синтетическими добавками из полилактата, полилактата-полигликолата и полиамида для получения биокерамических зубных имплантов (Smith et al. 2009) и пористых микросфер из диоксида $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$, используемых для создания костных имплантов ([Wu et al. 2010](#)).

Пористые гидрогели, используемые для регенерации мягких и твердых тканей, выполняют роль межклеточного биodeградируемого матрикса, который способствует росту и экспансии пересаженных клеток в организме реципиента (Mano et al. 2007). Для создания гидрогелей используют разнообразные природные и искусственные полимеры – полисахариды (гиалуроновая кислота, глюкозамингликаны, декстраны), полиспирты (полиэтиленгликоль), полипептиды (желатин, денатурированные сегменты фибриногена) и т.д., подвергающиеся различным химическим модификациям для контроля размеров пор, адгезивных свойств и степени пористости и способные к постепенной деградации внеклеточными ферментами по мере экспансии имплантированных клеток ([Lutolf et al. 2003](#); [Rizzi et al. 2006](#)). Помимо роли мягкого каркаса для трансплантируемых клеток, гидрогели используются как депо для длительной доставки различных ростовых и иных биомолекул (например, костных морфогенетических белков семейства BMP – регуляторов остеогенеза), стимулирующих пролиферацию и дифференцировку клеточного импланта ([Saito et al. 2005](#); [Rizzi et al. 2006](#)).

В ходе выбора и создания новых биоматериалов для тканевой инженерии повышенное внимание уделяют изучению и контролю их биологических характеристик – нетоксичности и нетоксигенности, биосовместимости (неиммуногенности), биodeградируемости, прочности, адгезивности для клеток и т.д. Количество и длина поперечных сшивок придают гидрогелям и прочим биоматериалам объем, пористость и прочность. В этом смысле перспективным выглядит использование в качестве поперечно-сшивающего агента структурных доменов бактериальных коллагеноподобных белков, образующих трехспиральные мотивы и не обладающих цитотоксическими и иммуногенными свойствами ([Peng et al. 2010](#)). При ремоделировании верхних дыхательных путей (bronхов и альвеол), эпителий которых богат внеклеточными металлопротеазами, инженерным каркасам придают свойства повышенной способности к биodeградации под действием именно металлопротеаз путем насыщения низкомолекулярными гиалуроновыми кислотами и пептидами, содержащими участки расщепления для металлопротеаз ([Kim J et al. 2008](#)). Для повышения адгезивных свойств биоинженерных каркасов по отношению к пересаживаемым клеткам в состав каркасов включают пептидные мотивы, содержащие участки связывания интегринов – поверхностных рецепторов, которые осуществляют межклеточные и тканевые взаимодействия ([Fischer et al. 2009](#)). Существует множество других подходов и стратегий, направленных на улучшение и оптимизацию биоинженерных свойств каркасов и имплантов.

Методы тканевой инженерии

Основными направлениями тканевой инженерии являются терапевтическое клонирование, биопринтинг и бионическая тканевая инженерия. Под терапевтическим клонированием понимают перенос ядра в безъядерную реципиентную яйцеклетку с целью получения потомства (клонов), генетически идентичного донорному организму. Яйцеклетка обладает необходимым потенциалом для репрограммирования пересаженного ядра взрослой соматической клетки в эмбриональное состояние, способное к индукции развития нового организма. Таким образом можно создавать практически неограниченный источник плюрипотентных СК (включая клетки, специфические для данного индивида) для успешного решения задач тканевой инженерии ([Koh and Atala 2004](#)). Другой тип клонирования называется репродуктивным клонированием, в результате которого появляется целый организм. Наиболее известным примером успешного использования репродуктивного клонирования является получение в 1997 г. овцы по кличке Долли ([Wilmut et al. 1997](#)).

Техника терапевтического клонирования имеет большие перспективы в борьбе с заболеваниями человека, вызванными мутациями в митохондриальной ДНК (мтДНК). Поскольку такие заболевания наследуются по материнской линии путем передачи зародышу ооцитарной цитоплазмы, содержащей митохондрии с мутантной ДНК, пересадка цитоплазмы с нормальными митохондриями или перенос ядра от женщины, имеющей мутацию в мтДНК, в нормальную лишённую собственного ядра яйцеклетку, должны привести к генетической коррекции потомства ([Bredenoord et al. 2008](#)). Недавнее успешное использование техники ядерного переноса на яйцеклетках приматов позволило получить потомство, унаследовавшее мтДНК от реципиентной яйцеклетки, а ядерную ДНК – исключительно от донора ([Tachibana et al. 2009](#)).

Одной из ближайших перспектив, определяющих дальнейшее развитие терапевтического клонирования, является создание банков замороженных незрелых яйцеклеток как исходного материала для техники ядерного переноса, поскольку источники свежих человеческих яйцеклеток крайне лимитированы ([Chang et al. 2009](#)). Необходимые методики криопрезервации с целью повышения выживаемости ооцитов и эмбрионов после размораживания отработаны в банках яйцеклеток сельскохозяйственных

животных ([Pereira and Marques 2008](#)) и, следовательно, могут быть использованы при организации криобанков человеческих клеток и эмбрионов.

Биопринтинг – это управляемый компьютером автоматический процесс создания биоматериалов, частей биологической ткани и целых органов с использованием технологии печати. Технология биопринтинга позволяет собирать с высокой степенью точности ансамбли различных типов СК и иных компонентов ткани и биоинженерных каркасных конструкций с целью искусственного воссоздания органа или ткани для последующей его пересадки в организм реципиента ([Mironov et al. 2006](#)). В качестве первых биопринтерных устройств использовали обыкновенные струйные принтеры, картриджи которых вместо чернил заполняли суспензией клеток. В дальнейшем устройства для биопринтинга были усовершенствованы в так называемые 3D-биопринтеры, предназначенные для получения трехмерных биоинженерных тканевых конструкций, имитирующих сложную организацию биологических органов и тканей ([Campbell and Weiss 2007](#)).

Эволюция развития технологии биопринтинга началась со сборки простейших дву- и трехмерных ансамблей (трубок, дисков, кубов, листов и т.д.) из стволовых и эмбриональных клеток, контролируемый рост и дифференцировка которых происходит в биореакторах ([King and Miller 2007](#)). В биореакторах ЭСК самопроизвольно образуют трехмерные агрегаты (так называемые эмбриоидные тела), внутри которых претерпевают дальнейшую дифференцировку ([Bratt-Leal et al. 2009](#)). В дальнейшем из гомогенных клеточных агрегатов формируются гетерогенные за счет природного средства определенных типов клеток друг к другу. Например, гладкомышечные клетки и фибробласты способны спонтанно образовывать смешанные сфероиды и микротрубки размером 300-500 мкм, из которых путем последовательного послойного биопринтинга можно вырастить микрососуды диаметром от 0.9 до 2.5 мм ([Norotte et al. 2009](#)). Данное тканеспецифическое свойство клеток позволяет относительно просто и быстро получать простые модели искусственной кожи, хрящей и нервов ([Bello et al. 2001](#)), микрососуды ([Au et al. 2008](#)) и упрощенный костный мозг ([Stoltz et al. 2006](#)).

Однако для разработки крупных сложноорганизованных трехмерных структур, каковым является биологический орган, прежде всего требуется решить проблему искусственной васкуляризации биоинженерного органа, представляющей собой сеть кровеносных сосудов различного калибра. Для решения данной проблемы следует разрешить ряд промежуточных задач, касающихся создания контактов между сосудами импланта и хозяина, роста сосудистого объема в соответствии с развитием ткани и предотвращения преждевременной или избыточной регрессии сосудов ([Lokmic and Mitchell 2008](#)). Способность сосудистых сфероидов самоорганизовываться в ветвящиеся сосуды более крупного диаметра облегчает процесс создания искусственной кровеносной системы, что, в свою очередь, создаст необходимые предпосылки и практические заделы на пути к созданию трехмерного искусственного органа ([Visconti et al. 2010](#)). Предварительная васкуляризация биоинженерного органа в условиях *in vitro* существенно облегчает его последующее приживание в реципиентном организме и интеграцию искусственной сосудистой системы с кровеносной системой хозяина, что было показано на пересадке предварительно васкуляризованных искусственных скелетной и сердечной мышц ([Levenberg et al. 2005](#); [Lesman et al. 2010](#)).

Другая проблема, которую требуется решить при создании искусственного органа, - это его иннервация, или создание сети искусственных нейронов, имитирующих периферическую нервную систему. Задача создания искусственной нервной системы облегчается биологическим свойством нервных клеток спонтанно образовывать между собой межклеточные контакты на расстоянии до 6 мм ([Haile et al. 2007](#)). Конструирование искусственных нервных волокон требует применения особых электропроводящих биоматериалов для улучшения проведения нервного импульса. В настоящее время в тканевой нейроинженерии происходит испытание таких токопроводящих материалов как

нанофибриллы из полипиррола или полианилина, однако биосовместимость этих проводников требует дальнейших исследований (Ghasemi-Mobarakeh et al. 2009; Subramanian et al. 2009).

Бионическая тканевая инженерия, или тканевая бионика, предназначена для разработки биоинженерных органов, частей органов и тканей, как можно более точно и полно имитирующих функции природных органов, с целью замены утраченных или нефункциональных органов или регенеративного лечения ран (Green 2008). При создании эффективных бионических имплантов важен подбор оптимального состава и структуры biomaterialов, обеспечивающих успешное замещение функции утраченного органа или ткани (Ma 2008). Важен также контроль и мониторинг приживления СК импланта с целью достижения быстрой и полной регенерации ткани: использование ростовых факторов для быстрой активации имплантированных клеток, контроль местной воспалительной реакции в имплантированной ткани и возможности развития реакции отторжения импланта. Отторжение импланта является наиболее серьезным осложнением при пересадке аллогенного костного мозга, возникающим в 35-50% случаев пересадки (Wang and Zhao 2009). Использование МСК костного мозга, опосредующих иммуномодуляторные свойства, являются крайне перспективным для лечения таких осложнений, особенно у реципиентов, не отвечающих на первичную терапию глюкокортикоидами (Tian et al. 2008).

Также одним из методов регенеративной медицины является метод клеточных листов. Инженерная ткань создается за счет соединения клеточных монослоев, так называемых клеточных листов, в трехмерную ткань с заданной пространственной ориентацией. Монослой создается за счет культивирования клеток на подложке из термосенситивного полимера, поли-(N-изопропилакриламида), который меняет свою конформацию в зависимости от температуры окружающей среды, тем самым позволяя удалить монослой клеток из сосуда, где он культивировался, без разрушения межклеточных связей (Haraguchi et al. 2011). Данная технология может быть применена для лечения таких заболеваний, как кардиомиопатия, нарушения зрения, язвы пищевода и диабета 1 типа (Elouimi-Hannachi et al. 2010). Образцы ткани, созданные с помощью технологии клеточных листов, существенно улучшают состояние животных в моделях заболеваний сердца (Yuji et al. 2011).

После успешного приживления трансплантированных клеток важно отслеживать протекание процесса ремоделирования имплантированной ткани, развитие и экспансию СК импланта в организме реципиента и умело направлять развитие клеток в сторону терминальной дифференцировки путем последовательного использования различных тканеспецифичных факторов дифференцировки. Для повышения регенеративного потенциала устойчивости к цитотоксическому действию локального воспаления, ишемии и гипоксии в участке пересадки, МСК генетически модифицируют (Song et al. 2010) или, например, непосредственно перед пересадкой выдерживают в присутствии провоспалительного цитокина - фактора некроза опухоли- α (Herrmann et al. 2010) или эстрадиола (Erwin et al. 2009), что приводит к усилению выработки VEGF – важного ростового фактора, способствующего приживлению имплантированных МСК при регенерации сердца и кровеносных сосудов.

Диагностические платформы

Одним из главных направлений применения диагностических технологий в регенеративной медицине является мониторинг поведения пересаженных клеток в реципиентном организме и контроль толерантности организма хозяина по отношению к импланту. Рутинный контроль иммунного статуса реципиента и иммуноопосредованной реакции на имплантированный орган или ткань осуществляется путем регулярной биопсии ткани и забора крови с последующим анализом иммунных биомаркеров. Эти маркеры включают определение репертуара дендритных клеток, профиля

циркулирующих антител и провоспалительных цитокинов, подсчет числа потенциально регуляторных CD4⁺ CD25⁺ и Vδ1⁺ T-клеточных популяций, а также получение профилей экспрессии маркерных генов (гены γδ T-клеточных рецепторов, рецепторов природных клеток-киллеров и негативных регуляторов пролиферации клеток) с использованием технологии микрочипов ([Martínez-Llordella et al. 2007](#)).

Технологии, основанные на получении изображения

Для мониторинга распределения, миграции и контроля пролиферации и дифференцировки трансплантированных СК используют технологии, основанные на получении изображения. Для прямого мониторинга пересаживаемые клетки перед сеансом трансплантации метят радионуклидами или магнитными наночастицами (например, оксидом железа или перфторкарбоном). Для получения изображений с использованием гамма-сцинтилляционных сканеров клетки метят ¹¹¹In-оксином или ¹¹¹In-трополоном (Jin et al. 2005), а для мониторинга с помощью позитронной эмиссионной томографии в качестве метки используют 2-[¹⁸F]-фтор-2-дезоксид-D-рибозу (Hofmann et al 2005) или гексадецил-4-[¹⁸F]-фторбензоат (Ma et al. 2005). Клетки, меченые магнитными маркерами, отслеживают с использованием техники парамагнитного резонанса (Lee et al. 2008). Однако данные процедуры позволяют отследить судьбу пересаженных клеток лишь до их первого деления и ограничены временем распада используемых радиоактивных меток.

Для непрямого контроля в пересаживаемые клетки вводят репортерные трансгены (например, люциферазу светлячка, флуоресцентные белки (GFP, RFP), рецептор трансферрина) и получают изображение с помощью билюминисцентных детекторов (Min et al. 2006) или позитронной эмиссионной томографии (Acton and Zhou 2008). Преимуществом методик непрямого контроля является возможность наблюдать за клетками в течение длительного срока и в режиме реального времени. Существенным преимуществом билюминисцентной детекции является ее повышенная биобезопасность ввиду отсутствия радиоактивной метки. Однако из-за эффекта тушения флуоресцентного сигнала при прохождении сквозь биологические ткани этот диагностический подход применим лишь к животным моделям небольшого размера (мышам, крысам), используемым для отработки методов трансплантации и изучения регенеративных свойств пересаженных клеток. В этом смысле мечение СК репортерным геном тимидинкиназы (изображение отслеживается по распаду радиоактивно меченого субстрата тимидинкиназной реакции) имеет большие перспективы для клинического использования, т.к. существенного ослабления радиоактивного сигнала при прохождении через ткани не происходит.

Большое практическое значение для длительного количественного и качественного мониторинга МСК человека после пересадки в опытные модели грызунов имеет репортерная система, экспрессирующая гибридный белок, который состоит из функциональных доменов красного флуоресцентного белка, люциферазы и герпесвирусной тимидинкиназы (Ray et al. 2004). Эта трехкомпонентная система позволяет следить за клетками с использованием различных методов детекции - позитронной эмиссионной томографии, билюминисценции и флуоресценции. Также весьма полезным для мониторинга трансплантированных СК является введение в них репортерного трансгена Na⁺/I⁻ симпортера, который экспрессируется лишь в некоторых тканях (щитовидная железа, слюнные и молочные железы, слизистая кишечника) и позволяет использовать для детекции радиоактивные изотопы йода (Chung 2002).

Сканирующие технологии широко используются для изучения поведения (пролиферации, миграции, метастазов) и свойств раковых клеток человека, пересаженных в опытных животных. Например, с помощью данных подходов определяют появление на

поверхности раковых клеток рецептора хемокина CXCR4, являющегося маркером перехода опухоли в метастазирующую стадию (Arya et al. 2007).

Микрожидкостные устройства

Микроокружение играет важнейшую роль в развитии СК. Концепция существования «ниши стволовых клеток» была выдвинута в конце 70-х годов (Walker et al. 2009). Последующие опыты на зародышевых клетках дрозофилы позволили установить важность межклеточных взаимодействий внутри ниши и систему межклеточных сигналов, определяющих баланс между самообновлением и дифференцировкой СК в составе ниши (Fuller and Spradling 2007). Важно отметить, что большинство таких сигналов обнаруживает эволюционный консерватизм, встречаясь как у позвоночных, так и беспозвоночных. Результаты исследований микроокружения зародышевых клеток дрозофилы свидетельствовали о потенциальной возможности достижения контроля над судьбой и функцией СК в условиях *in vitro* путем создания биоинженерных систем, искусственно воссоздающих элементы ниши.

Недавно это стало возможным после разработки микрожидкостных устройств. Данные устройства представляют собой микроячейки в полимерных подложках, содержащие микроколичества жидкости. В микроячейки с помощью микроэлектромеханических устройств (роботов-микродозаторов) помещают определенные количества клеток, биоактивных молекул, элементов межклеточного матрикса и т.д. с целью искусственного моделирования и имитирования условий микроокружения в составе ниши. Получаемые в итоге клеточные микрочипы находят широкое применение в клеточной терапии и биоинженерии для изучения свойств СК, взаимодействия между СК и биоинженерными материалами, используемыми для конструирования трансплантационных каркасов и матриксов, а также для исследования влияния микроокружения на СК (Vazin and Schaffer 2010).

С использованием микрожидкостных устройств искусственно созданы микроокружения, имитирующие строение различных ниш взрослых СК – ниш ГСК, ниш нервных СК, эпителиальных ниш и т.д. Установлена важность и структура межклеточных контактов между СК и нестволовыми клетками, опосредуемыми поверхностными молекулами клеточной адгезии (кадеринами, эфринами, рецепторами Notch и другими). Например, кадерины вовлечены не только в межклеточные контакты, удерживающие СК в нише (Walker et al. 2009), но и в контроль самообновления и дифференцировки нервных СК (Karpowicz et al. 2009). Сигнальные взаимодействия между ГСК и остеобластами в нишах костного мозга опосредуются Notch-рецепторами, которые участвуют в регуляции пролиферации и функции ГСК (Calvi et al. 2003).

С использованием клеточных чипов показана важная роль межклеточного матрикса и его структурных компонентов (коллагена, ламинина, фибронектина, интегринов, глюкозамингликанов и проч.) как в формировании структурного каркаса ниши, так и в регуляции поведения СК внутри ниши. Интегрины через посредство рецепторов участвуют в регуляции сигнального микроокружения СК (Hall et al. 2006). Гиалуроновая кислота, являющаяся основным компонентом внеклеточного матрикса на поверхности стромальных клеток костного мозга и ГСК, вовлечена в регуляцию гемопозеза в нише ГСК (Nilsson et al 2003). Данное наблюдение имеет важные практические последствия, т.к. рекомендует гиалуроновую кислоту в качестве привлекательного биоактивного компонента при создании гидрогелей и других биоинженерных каркасов, используемых в трансплантации. Многие открытия, сделанные в результате исследования влияния компонентов межклеточного матрикса на СК с помощью клеточных микрочипов, были затем практически реализованы при разработке биоактивных искусственных матриксов.

Так, включение в состав синтетических гидрогелей из полиакриламида и акриловой кислоты трехзвенных пептидных мотивов, связывающих интегрин, усиливало

адгезивные свойства геля и ускорило обновление ЭСК человека (Li et al. 2006). Аналогично, введение 5-членного пептидного мотива из молекулы ламинина, стимулирующего рост нервных волокон, в состав искусственных нанофибрилл, способствовало специфической дифференцировке нервных СК в клетки нейрональной линии (Silva et al. 2008).

Кроме того, опыты по реконструкции межклеточного матрикса в микрочайках клеточных чипов показали, что матриксные компоненты участвуют в формировании локального градиента концентрации сигнальных факторов. Например, показана способность гепарансульфатпротеогликана концентрировать вокруг себя молекулы фактора роста фибробластов-2 (Mercier et al. 2002). Данное свойство было использовано при создании матриксов из фибрина с ковалентно пришитыми молекулами гепарина, способного удерживать в себе и затем постепенно высвобождать сигнальные факторы, стимулирующие пролиферацию пересаженных клеток имплантата (Willert et al. 2008).

Помимо регенеративной медицины, микрожидкостные устройства нашли применение и в других областях биомедицины. Разработаны микрожидкостные системы с использованием иммуномагнитных частиц и иных подходов для высокочувствительного обнаружения патогенных микроорганизмов и их продуктов – вирусов (Huh et al. 2009), бактерий (Qiu et al. 2009), токсинов (Meagher et al. 2008), вирусной РНК (Zaytseva et al. 2005). Современные микрожидкостные биосенсорные системы также позволяют проводить быстрый анализ крови и других биологических материалов на наличие раковых биомаркеров (Yan et al. 2009), аллергенных антител (Tai et al. 2009) и иных «вредных» молекул. Входящие в состав данных устройств наночастицы, состоящие коллоидного золота или сверхпарамагнитного оксида азота, ковалентно связаны с антителами, олигонуклеотидами и прочими молекулами, обладающими высоким сродством к биомолекулам, которые требуется идентифицировать. Это позволяет обнаружить данные молекулы с высокой избирательностью в таких сложных мультикомпонентных системах, как кровь, лизаты клеток и т.д. Обладая большой пропускной способностью, микрожидкостные системы имеют несомненные перспективы для массового использования в клинической диагностике для проведения высокопроцессивного экспресс-анализа клинических образцов.

Другие направления регенеративной медицины

Немаловажное значение имеют направления регенеративной медицины, ориентированные на замедление процессов биологического старения организма. Для выработки наиболее оптимальных стратегий антистарения важно своевременно отследить признаки и маркеры возрастных изменений тканей и органов, ведущих к ослаблению или нарушению их нормальной функции и к развитию возрастных патологий.

Борьба с амилоидными отложениями как пример нового подхода к лечению и профилактике болезни Альцгеймера

Развитие таких возрастных нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона, связано с патологическим отложением полипептидных агрегатов бета-амилоида, альфа-синуклеина, тау-белка и хантинтина, которое приводит к нарушению проведения нервного импульса, дегенерации нервных волокон и прочим негативным последствиям (Aguzzi and O'Connor 2010). Поэтому разработка практических подходов, направленных на обнаружение и разрушение таких белковых отложений, а также препятствующих образованию подобных белковых агрегатов очень важна для успешной профилактики, диагностики и лечения нейродегенеративных поражений мозга.

В настоящее время для обнаружения амилоидных бляшек используют меченые бляшек специфическими молекулярными зондами с последующим получением картины распределения данных отложений с помощью позитронной и фотонной эмиссионной

томографии (Ono et al. 2009). Для диагностики заболевания и количественной оценки амилоидогенного статуса также определяют уровни циркулирующих биомаркеров болезни Альцгеймера (общего и фосфорилированного тау-белка, амилоидного белка-предшественника, сывороточного Р-компонента и др.) (Siemers et al. 2010).

Лекарства, используемые для лечения болезни Альцгеймера (ингибиторы холинэстеразы, блокаторы рецептора N-метил-D-аспартата) имеют ограниченный терапевтический потенциал, поскольку направлены на восстановление нейротрансмиттерных функций нервов, а не против этиологических агентов болезни – отложений бета-амилоида и тау-белка. Поэтому с целью предотвращения агрегации амилоида и тау-белка разработаны новые мощные ингибиторы агрегации амилоида и ферментов амилоидного метаболизма. Современные терапевтические агенты включают РВТ-2 (ингибитор агрегации амилоида), бацинеумаб (моноклональное антитело против амилоида; проходит 3-ю фазу клинических испытаний), LY-450139 (ингибитор гамма-секретазы, катализирующей синтез бета-амилоида; проходит 3-ю фазу испытаний), CTS-21166 (ингибитор бета-секретазы; допущен к испытаниям) и ЕНТ-0202 (ингибитор альфа-секретазы; 2-я фаза испытаний). Против тау-белка получены новые лекарства – хлорид метилтиония (ингибитор агрегации тау-белка; 1-я фаза испытаний) и агент NP-12 (ингибитор гликогенсинтазы-3, фосфорилирующей тау-белок; 2-я фаза испытаний). Разработка нового поколения лекарственных препаратов позволяет надеяться на достижение решительного успеха в лечении болезни Альцгеймера в течение ближайших 5 лет (Panza et al. 2009).

Установлено, что накопление ионов тяжелых металлов (Cu^{2+} и Zn^{2+}) способствует развитию деструктивных процессов в мозге с участием механизмов окислительного стресса и участия в образовании амилоидных отложений (Cuajungco et al. 2005). Поэтому разработка и применение хелатообразующих агентов, удаляющих избыток ионов цинка и меди, а также способствующих распаду амилоидных бляшек имеет немаловажное значение для профилактики и лечения нейродегенеративных болезней. В качестве новых разработок в данной области следует упомянуть D-пенициламин (Zn^{2+} -специфический хелатор), кликвенол (антибиотик, имеющий сродство к Zn^{2+} и Cu^{2+}), DP-109 (липофильный хелатор), десферриоксамин и деферипрон (Fe^{2+} -хелаторы, имеющие сродство к Cu^{2+} и Zn^{2+}) (Petri et al. 2007; Liu et al. 2009). При этом для избирательной доставки хелатирующих агентов к местам осаждения комплексов бета-амилоид-металл предложено использование наночастиц, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер (Cui et al. 2005; Liu et al. 2009).

Борьба с накоплением продуктов неферментативного гликозилирования

Накопление неферментативно гликозилированных белков и продуктов их распада (конечных продуктов гликозилирования - КПГ) напрямую связано с дисфункцией сосудов при сахарном диабете, что способствует развитию разнообразных микро- и макрососудистых осложнений у диабетических больных (Ahmed et al. 2005). С возрастом в организме (прежде всего, в крови и стенках сосудов) также происходит постепенное увеличение содержания неферментативно гликозилированных белков и КПГ, что позволяет рассматривать данные характеристики в качестве потенциальных биомаркеров старения (Ulrich and Cerami 2001). Накопление конечных продуктов гликозилирования в стенке кровеносного сосуда и миокарде вызывает образование поперечных сшивок между молекулами коллагена, что приводит к потере коллагеном эластичности и, как следствие, уменьшению упругости сосудов и сердца у больных диабетом и пожилых людей (Aronson 2003).

Свое «вредное» влияние на окружающие ткани КПГ осуществляют через посредство связывания с поверхностным рецептором КПГ (РКПГ или RAGE). Накопление КПГ стимулирует экспрессию рецептора и приводит к увеличению циркулирующих в крови растворимой изоформы рецептора, не содержащей

трансмембранный домен, и внеклеточного домена РКПГ (Yan et al. 2007). Увеличение содержания данных молекул в крови связано с активацией воспалительных и деструктивных процессов в сосудах и миокарде, что способствует развитию сердечно-сосудистой патологии и ускоряет старение (Yan et al. 2003). Важно отметить, что амилоид также способен связываться с РКПГ и способствовать развитию воспалительных процессов при болезни Альцгеймера (Chen et al. 2007).

Ввиду заметной роли КППГ и РКПГ в патогенезе различных хронических заболеваний и старении, данные молекулы являются приоритетными мишенями для ингибирующего действия различных терапевтических агентов. Разработанный недавно ингибитор рецептора КППГ PF-04494700 (антагонист рецептора) проходит 2-ю фазу клинических испытаний стадии разработки (Rafii and Aisen 2009). Недавние исследования также выявили супрессирующее воздействие на экспрессию РКПГ традиционных ингибиторов сосудистого (тип 1) рецептора ангиотензина (ирбесартана и телмизартана) и нифедипина (блокатор Ca^{2+} -каналов) (Yamagishi et al. 2008; Matsui et al. 2009, 2010).

Для ингибирования чрезмерного образования КППГ предложено использование природных и синтетических агентов, таких LR-90, флоретин, флоридзин и стилбенглюкозид, инактивирующих дикарбонильные соединения, глиоксаль и метилглиоксаль, участвующие в неферментативном гликозилировании белков (Shao et al. 2008; Lv et al. 2010). Аминогуанидин, пиридоксамин и его аналоги способны напрямую ингибировать образование КППГ (Cameron et al. 2005). При этом пиридоксамин также проявляет антиоксидантные свойства, ингибируя образование конечных продуктов перекисного окисления липидов (Metz et al. 2003). Алагебриум (хлорид 3-фенацил-4,5-диметилтиазолия) - основоположник класса тиазолиновых лекарств - и его производные (ALT-711, C16, C36, TRC4149 и другие) разрушают межмолекулярные сшивки коллагена, восстанавливая нормальную функцию поврежденных сосудов (Bakris et al. 2004; Pathak et al. 2008).

Борьба со старением кожи и возрастными изменениями в межклеточном матриксе

Старение кожи происходит под влиянием многих факторов, включая метаболические, генетические, эндокринные (гормональные) факторы и факторы внешней среды (Callaghan and Wilhelm 2008). Ультрафиолетовое (УФ) излучение играет важную роль в старении кожи, причем молекулярные механизмы УФ-индуцированного старения кожи совпадают с характером возрастных изменений в тканях кожи. Поэтому фотоиндуцируемое старение кожи можно рассматривать в качестве модели возрастного старения кожи. Под воздействием УФ-радиации происходит активация окислительного стресса, приводящего к комплексным деструктивным процессам в кожных тканях и повреждениям структурных компонентов кожи (ДНК, белков и липидов), в результате чего изменяется активность и функция белков и нарушается нормальная регуляция сигнальных путей (Wenk et al. 2001). Нарушение регуляторных путей приводит к активации экспрессии матриксных металлопротеаз (ММП), снижению синтеза проколлагена и накоплению повреждений в соединительной ткани.

УФ-излучение активирует продукцию ММП через зависимую от MAP-киназ индукцию транскрипционного фактора AP-1, который регулирует экспрессию нескольких ММП: коллагеназы-1 (ММП-1), стромелизина-1 (ММП3) и желатиназы В (ММП-9). Коллагеназа-1 участвует в деградации коллагенов типа I и III, стромелизин-1 подвергает продукты деградации коллагена дальнейшему расщеплению, а желатиназа В расщепляет коллаген типа IV, а также отвечает за активацию проколлагеназы-1 (Brenneisen et al. 2002).

Кроме того, AP-1 является негативным регулятором транскрипции генов COL1A1 и COL1A2, кодирующих проколлаген типа I, и активация данного фактора сопряжена с уменьшением коллагенового синтеза (Katai et al. 1992).

Регенеративные стратегии, направленные на восстановление структуры и функции кожи, помимо клеточной терапии, включают разработку новых терапевтических

агентов, включая поиск, создание и использование синтетических и природных ингибиторов ММП. В настоящее время для ингибирования ММП традиционно используют антибиотики тетрациклинового ряда, способные связываться с Zn^{2+} , входящим в состав активного центра ММП (Sapadin and Fleischmajer 2006). Диоксициклин является наиболее мощным ингибитором среди тетрациклинов, эффективно действующим против широкого круга ММП (Peterson 2004). В роли ингибиторов экспрессии ММП используются ретиноиды (Schoenermark et al. 1999). Недавно было разработано новое поколение Zn^{2+} -хелатирующих ингибиторов ММП, относящихся к классу сульфониимидгидроксаматов и обладающих повышенной ингибирующей способностью за счет введения сульфонамидной группы, которая образует дополнительные водородные связи в активном центре ММП (Cheng et al. 2008). Ингибиторы сульфонилпирролидинового ряда имитируют пролин-содержащие полипептиды, являющиеся субстратом для ММП (Li et al. 2007).

Существуют 4 вида белковых тканевых ингибиторов ММП (TIMP), ингибирующих активность почти всех из 25 известных к настоящему времени ММП путем связывания с молекулами фермента в межклеточном матриксе (Verstappen and Von den Hoff 2006). Однако, ингибируя зрелые протеазы, TIMP-2 и TIMP-3 участвуют в активации многих предшественников ММП (например, проММП-2) (Zhao et al. 2004). Таким образом, TIMP вовлечены в сложную систему регуляции ремоделирования межклеточного матрикса и активности ММП на уровне белка, которая требует дальнейшего изучения. TIMP представляют собой потенциальные терапевтические мишени для разработки новых лекарств. Кроме действия на ММП, TIMP проявляют ряд других биологических активностей, включая рост и дифференцировку клеток, клеточную миграцию, регуляцию апоптоза и синаптической пластичности, что делает их свойствами привлекательными для использования при конструировании биоинженерных межклеточных матриксов и каркасов для клеточной терапии (Brew and Nagase 2010).

Поскольку УФ-индуцируемое старение кожи тесно связано с активацией воспаления, для регенеративных целей используются противовоспалительные агенты (ингибиторы выработки провоспалительных цитокинов, ингибиторы циклооксигеназы) (Pillai et al. 2005). Общерегенеративным действием обладают кремы, содержащие добавки различных природных антиоксидантов (ретиноидов и т.д.) (Palmer and Kitchin 2010). В качестве новых перспективных антиоксидантных агентов могут быть использованы природные полифенолы, имеющиеся в зеленом чае и прошедшие успешные испытания на животных моделях (Nichols and Katiyar 2010).

Интересным выглядит подход, используемый с 1997 г. в пластической хирургии для удаления внешних дефектов на коже (морщин и рубцов). Проблемные места кожи обрабатывают игольчатым катушечным устройством, что стимулирует синтез коллагена в подкожной жировой клетчатке и способствует рассасыванию рубцов и распрямлению морщин (Fernandes and Signorini 2008).

Заключение

Современная регенеративная медицина представляет собой наиболее передовую и бурно развивающуюся отрасль медицины. Глобальный рынок технологий клеточной терапии, тканевой инженерии и сопутствующих отраслей оценивается в 6.9 млрд. долл, с ежегодным приростом 18%. Из них, 4.35 млн. долл. приходится на развитие ортопедических устройств и восстановление опорно-двигательного аппарата, 679 млн. – на практические приложения в области восстановления и лечения кожи, 468 млн. – на регенерацию сердечно-сосудистой системы и 374 млн – на хирургию зубов и полости рта.

В десятку мировых лидеров в области регенеративной медицины входят США (60% мировых затрат, объем ежегодного государственного финансирования на регенеративную медицину от национальных институтов здоровья в 2008 г. - 938 млн.долл), Великобритания, Юж. Корея, Канада, Австралия, Сингапур (в этих странах на долю

государственного финансирования ежегодно приходится от 25 до 45 млн. долл), Япония, Китай, Швеция и Израиль (в последней четверке стран суммы ежегодного госфинансирования составляют от 3.5 до 20 млн.долл). Подобные тенденции в распределении лидеров в области регенеративной медицины должны сохраниться в ближайшие 5 лет, хотя очень вероятен рывок Китая, в котором в развитие восстановительных технологий с использованием СК государство намерено вложить до 126 млн. долл в течение 2008-13 г.г.

В области тканевой инженерии и создания биоинженерных материалов ряд проблем требует дальнейшего изучения. Это касается дальнейшей оптимизации и выбора материалов для инженерии каркасов и искусственных матриц, взаимодействия между клетками и компонентами матриц, функциональной интеграции ткани и контроля дифференцировки имплантированных в клетках в условиях супрессии гуморального иммунного ответа организма реципиента.

В клеточной терапии необходим дальнейший анализ и подбор неонкогенных регуляторных факторов, контролирующих дифференцировку клеток. Требуется продолжение изучения свойств ИПСК разного тканевого происхождения, имеющих огромный терапевтический потенциал, с постепенным переходом к их клиническим испытаниям. Получение пациент-специфичных ИПСК и их использование для изучения различных болезней и различий в индивидуальном ответе на лекарства должно привести к настоящему буму в развитии персональной медицины. Хотя в данный момент под контролем Национальных институтов здоровья в США проводится свыше 900 клинических испытаний СК, их число в ближайшее время существенно увеличится в связи с внедрением новых типов СК (например, МСК из пуповинной крови). Развитие клеточных чипов и их приложений для массового скрининга потенциальных лекарств получит дальнейшее распространение, что должно привести к открытию новых синтетических стимуляторов активации СК и их экспансии после пересадки.

Технологии тканевой инженерии, имеющие приоритетное значение в ближайшие 10 лет, очевидно, будут включать репарацию нервов, восстановление зрения, антираковую терапию и борьбу с иммунными нарушениями и сердечно-сосудистыми патологиями.

С учетом скорости развития научно-технологического прогресса, вполне вероятно, что в течение ближайших 10 лет станет возможным создание таких органов, как печень, почки, сердце и легкие с помощью методов регенеративной медицины. Развитие этих технологий позволит лечить множество возраст зависимых заболеваний, а также существенно продлить жизнь пациентам.

