

Сравнительный анализ различных подходов для определения оптимальных методов децеллюризации тканей и органов, засеивания каркасов (натуральных и синтетических), определения оптимальных источников клеток для тканевой инженерии, выбор материалов для создания каркаса тканеинженерного органа

Введение

Причиной большинства смертей в развитых странах является критическое разрушение тканей, ведущее к потере функции органа (Kochanek et al., 2011). Терапевтические вмешательства, как правило, не способны остановить дальнейшее разрушение ткани, тогда как хирургическое удаление органа лишает организм возможности использовать свой собственный регенеративный потенциал. В настоящее время достигнуты значительные успехи в снижении скорости деградации ткани и минимизации разрушительных последствий в острый период болезни, тем не менее восстановление поврежденного или утерянного органа остается острой проблемой. Мы до сих пор не умеем управлять регенеративным потенциалом самого организма, а создание синтетических органов сталкивается с проблемами биосовместимости, отсутствия авторегуляции, с необходимостью постоянного внешнего источника энергии, вызывает осложнения в виде инфекции и образования тромбов. Применение аллотрансплантантов также не решает проблему, т к требует жесткой иммуносупрессии для предотвращения отторжения, кроме того количество донорского материала в несколько раз меньше реальных потребностей. Новой многообещающей стратегией в репарации или замещении поврежденных органов и тканей является тканевая инженерия (Ott et al., 2008). В данной стратегии трансплантант представляет собой живую ткань, созданную *ex vivo* и состоящую из клеток на биосовместимом или биодegradуемом носителе, которая приживается и поддерживается в организме реципиента. На сегодняшний день уже существует ряд примеров применения биоинженерных тканей и органов в клинической практике (Dohmen et al., 2011, Atala et al., 2006, Raya-Rivera et al., 2011, Macchiarini et al., 2008, Biancosino et., 2006, Zehr et al., 2005, Cebotari et al., 2006, Brewer et al., 2011), а также множество экспериментальных примеров (Ott et al, 2011 и ссылки в нем). В основе совершенствования методов тканевой инженерии лежат оптимальный выбор материала каркаса (матрикса), источника клеток и условий заселения каркаса, эффективность которых должна быть оценена по множеству параметров, включающих как свойства самого импланта, так и состояние реципиента в кратко-, средне- и долгосрочный постоперационные периоды.

Биоматериалы в создании каркасов для тканевой инженерии

Каркасы биоинженерного органа должны повторять механические и биологические свойства внеклеточного матрикса целевого органа, т е иметь трехмерную структуру, способствующую прикреплению, росту и размножению соответствующего типа клеток, обеспечивать миграцию клеток и проток к прикрепленным клеткам клеточных пептидов адгезии и ростовых факторов (Kim et al., 1998), а также обеспечивать механическую прочность и стабильность на уровне целого органа. Недостаточная биосовместимость материала каркаса может привести к воспалительной реакции с последующим отторжением органа и/или некрозом. Поэтому в настоящее время ведется активный поиск биосовместимых материалов, которые обеспечивали бы механическую стабильность органа на этапе заживления и формирования новой ткани, а затем на более поздних этапах не препятствовали бы дальнейшему формированию ткани. Кроме того, продукты деградации материала каркаса, если таковые имеются, должны достаточно эффективно метаболизироваться, не допуская накопления до токсических для организма локальных концентраций веществ (Bergsma et al 1995). Биоматериалы, используемые в тканевой инженерии можно условно разделить на три больших группы: природные материалы (например, коллаген, фибрин, альгинаты (Li et al 1995, Silver et al

1992, Sams et al 1995, Smidsrod et al 1990, Lim et al 1980)), тканевые внеклеточные матриксы (Dahms et al 1998, Yoo et al 1998, Piechota et al 1998, Chen et al 1999), синтетические биодegradуемые полимеры, такие как, полигликолиды, полилактиды, их сополимеры и др. (Mikos et al 1994, Choi et al 2008, Lee et al 2008).

Каркасы из природных материалов

Отличительной чертой природных материалов является их способность мимикрировать нативные свойства структурных белков и воспроизводить их механические характеристики. Однако, успешное применение природных материалов будет зависеть от того, насколько они обеспечивают клеточную миграцию, юю пролиферацию.

Коллаген – один из наиболее широко распространенных природных материалов, каждая ткань характеризуется своим вариантом коллагена, который и используется при ее реконструировании (Alberts et al., 1994). Материал обладает значительной устойчивостью к деформации (Buttafoco et al., 2006, Ottani et al., 2001). Применение находят как коллагеновый гель, так и коллагеновые фибриллы, полученные из очищенного коллагена. Они обладают сравнительно низкой иммуногенностью и не вызывают острого воспаления (Nicolas et al., 1997). Интегрин-связывающие последовательности коллагена способствуют клеточной адгезии. Широкое применение коллаген находит в тканевой инженерии сосудов (Habermehl et al., 2005). Для достижения механической прочности конструкций из коллагена используются различные кросс-сшивающие агенты, наиболее применимым из которых является глутаровый альдегид (Charulatha et al., 2003). Однако, его цитотоксичность привела к разработке альтернативных методов кросс-сшивок, таких как энзиматические методы с использованием лизил-оксидазы и транsgлутаминазы, а также фото-кроссшивание (Brinkman et al 2003, Elbjeirami et al., 2003, Orban et al., 2004). Другим параметром, модулирующим механические свойства коллагеновых конструкций, является расположение и взаимная ориентация фибрилл коллагена (Hirai et al 1995, Nerem et al., 2004, Baguneid et al., 2004, L'Heureux et al., 1993, Seliktar et al., 2000). Тем не менее, трубчатые коллагеновые конструкции обладают недостаточной прочностью. В сердечно-сосудистой хирургии этот факт привел исследователей к использованию фибринового геля, как более эластичного материала (Cummins et al., 2004). Фибрин формируется при полимеризации фибриногена крови. Преимущества этого метода заключаются в использовании собственной крови пациента, предотвращающем отторжение и воспалительную реакцию (Ye et al., 2000), кроме того фибрин связывается с белками фибронектоном и VEGF, определяющими клеточные функции (Clark et al., 2003). *In vivo* деградация фибрина может контролироваться протеиназным ингибитором апротонином, а также кросс-сшивающими агентами (Jockenhoevel et al., 2001). Шварц с коллегами использовали фибриновый матрикс с инкорпорированными гладкомышечными и эндотелиальными клетками в создании имплантата сосуда ягненка (Swartz et al., 2005). Гистологическое исследование через 15 недель после имплантации показало почти нативную целостность органа, а также присутствие коллагена и эластина. Другие авторы также сообщают о формировании значительного количества коллагена и белков межклеточного матрикса гладкомышечными клетками, помещенными в фибриновые гели при реконструкции сосудов (Long et al., 2003, Grassl et al., 2003).

В последнее время развитие рекомбинантных технологий позволяет получать полимеры белков межклеточного матрикса, которые не только мимикрируют основной белок матрикса (Chang et al., 1988, Petka et al., 1998, Urry et al., 1997, Urry et al., 1998), но и содержат сигналы, направляющие дифференцировку *in vivo* (Nagapudi et al., 2005, Cappelletto et al., 1990, McGrath et al., 1990, Meyer et al., 2002). Для использования значительных количеств рекомбинантных белков может быть задействовано микробиологическое производство. Внутри бактериальной клетки белки синтезируются и сразу сами собираются в 3D структуры (Petka et al., 1998, Nagarsekar et al., 2003).

Тканевые внеклеточные матрицы (ВКМ)

Неспособность природных материалов полностью воспроизводить сложную структуру межклеточного матрикса привело к необходимости использовать децеллюлярные (с удаленными клетками) естественные межклеточные матрицы, полученные от доноров. Использование децеллюлярных ВКМ доноров в тканевой инженерии и регенеративной медицине с каждым годом растет, в настоящее время разработаны методики получения ВКМ для тканей дермы, тонкого кишечника, мезотелия, перикарда, а также для целых органов (Ott et al., 2008, Uygun et al., 2010, Petersen et al., 2010, Waiwright et al., 2010, Cortiella et al., 2010). Сохранение тканевой специфичности полученных ВКМ охарактеризована для печени (Uygun et al., 2010, Sellaro et al., 2010), дыхательных путей (10,30), нервов (Karabekmez et al 2009), жировой ткани (Flynn et al ., 2010) и молочных желез (Wicha et al., 1982).

Было показано, что ВКМ способны стимулировать клеточную пролиферацию, хемотаксис (Vorotnikova et al 2010, Bornstein et al., 2002), дифференцировку (Barkan et al., 2010, Allen et al., 2010, Cortiella et al., 2010, Sellaro et al., 2010, cheng et al., 2009, Ross et al., 2009, Stern et al., 2009), а также ответное ремоделирование тканей реципиента (Xu et al., 2010, Pakerh et al 2009, Valentin et al., 2010). По видимому, такой эффект связан с трехмерной ультраструктурой ВКМ, свойствами его поверхности, а также с остатками клеточного материала на матриксе (Brown et al ., 2009, Zhang et al., 2010, Xu et al., 2008).

Несмотря на то, что ВКМ существенно стимулируют репарацию ткани, успех их применения находится в сильной зависимости от способа их получения (метода децеллюляции), который при условиях, подобранных неудачно, может приводить к потере механических и биологических свойств (Petersen et al., 2010, Burch et al., 2010, Gorshevsky et al 2005, Rice et al ., 2010). Условия должны подбираться с учетом особенностей ткани плотности, толщине, содержанию липидов и тд. Также необходимо учитывать, что каждый агент, используемый для целлюляции, повреждает ВМК в той или иной степени, и речь идет лишь о минимизации последствий. Анализ наиболее применяемых агентов приведен в табл.1.

Таблица 1. Химические агенты и методы децеллюризации тканей.

Химический агент/метод	Механизм действия	Влияние на ВКМ	ссылки
Кислоты и щелочи	Солюбилизация цитоплазматических компонентов клетки, разрушение нуклеиновых кислот, частичная денатурация белков	Подвергаются разрушению также коллаген, ростовые факторы, глюкозаминогликаны	Brown et al 2009, Dong et al 2009, Prasertsung et al 2008, Reing et al 2010, Deeken et al 2010, Rosario et al 2008, Wainwright et al 2010, Hodde et al 2002, Gorschewsky et al 2005, Brown et al 2010, Frevtes et al 2008, Price et al 2010, Bolland et al 2007, Remlinger et al 2010
Гипотонические или гипертонические растворы	Лизис клеток вследствие осмотического шока, разрушение	Неэффективно удаляются остатки клеток	Merritt et al 2010, Guo et al 2010, Bolland et al 2007, Frevtes et al 2008, Yang et al 2009,

	ДНК-белковых взаимодействий		Xu et al 2007, Gorschewsky et al 2005, Stern et al 2009, Ross et al 2009, Wicha et al 1982, Flynn et al 2010, Rosario et al 2008, Ozeki et al 2006, Zhou et al 2010, Courtman et al 1994, Yang et al 2010, Meyer et al 2006, Dong et al 2009
Неионные детергенты ТритонX100	Разрушение ДНК-белковых, липид-липидных, липид-белковых взаимодействий, и в меньшей степени белок-белковых взаимодействий	Результат зависит от типа ткани, большая эффективность на тонких тканях	Ott et al 2008, Uygun et al 2010, Nakayama et al 2010, Brown et al 2009, Dong et al 2009, Reing et al 2010, Du et al 2010, Rieder et al 2004, Meyer et al 2006, Lumpkins et al 2008, Yang et al 2010, Courtman et al 1994, Kasimir et al 2003, Funamoto et al 2010, Woods et al 2005, Deeken et al 2010, Cartmell et al 2000, Grauss et al 2005, Zhou et al 2010, Ozeki et al 2006, Sasaki et al 2009, Wainwright et al 2010, Sellaro et al 2010, Ross et al 2009, Stern et al 2009, Hudson et al 2004, Brown et al 2010, Yang et al 2009, Price et al 2010, Shupe et al 2010, Guo et al 2010, Remlinger et al 2010
Ионные детергенты (SDS, дезоксихолат натрия, тритонX200)	Разрушение клеточной и ядерной мембран, денатурация белков	Эффективно удаляют остатки ядерных и цитоплазматических белков даже из твердых тканей, также удаляются глюкозаминогликаны, коллаген и факторы роста. Эффективность применения зависит от типа и толщины	Conconi et al 2005, Rose et al 2009, Elder et al 2010, Chen et al 2004, Petersen et al 2010, Bolland et al 2007, Shupe et al 2010, Henderson et al 2010, Price et al 2010, Guo et al 2010, Merritt et al 2010, deQuach et al 2010, Yang et al 2009,

		ткани	Brown et al 2010, Hudson et al 2004, Gui et al 2010, Cebotari et al 2010, Rosario et al 2008, Wainwright et al 2010, Cortiella et al 2010, Sellaro et al 2010, Tudoreche et al 2007, Zhou et al 2010, Ozeki et al 2006, Sasaki et al 2009, Ott et al 2010
Бимодальные детергенты (CHAPS, сульфобетаин 10 и 16)	Совмещают свойства ионных и неионных детергентов	Эффективно удаляют клетки с умеренным разрушением ультраструктуры ВКМ в тонких тканях	Petersen et al 2010, Du et al 2010, Gui et al 2010, Hudson et al 2004
спирт	Лизис клеток вследствие дегидратации, солюбилизации и удаления липидов	Эффективно удаляет клетки даже из твердых тканей, но приводит в кросс-сшивкам белков, в т ч коллагена ВКМ	Prasertsung et al 2008, Reing et al; 2010, Lumpkins et al 2008, Flynn et al 2010, Wicha et al 1992, Gorshevsky et al 2005, Gorshevsky et al 2005 (2), Levy et al 2003, Brown et al 2010, Montoya et al 2009, Sawada et al 2008
ацетон	Лизис клеток вследствие дегидратации, солюбилизации и удаления липидов	Эффективно удаляет клетки даже из твердых тканей, но приводит в кросс-сшивкам белков, в т ч коллагена ВКМ	Montoya et al 2009, Gorshevsky et al 2005, Gorshevsky et al 2005 (2), Lumpkins et al 2008
трибутилфосфат	Формирует стабильные комплексы с металлами, разрушение белок-белковых взаимодействий	Эффективность зависит от типа ткани, в случае твердых тканей теряется коллаген, но остаются механические свойства ВКМ	Woods et al 2005, Deeken et al 2010, Cartmell et al 2000
Нуклеазы	Гидролиз цепей ДНК и РНК	Сложно удалять из тканей после обработки, может вызывать иммунный ответ	Petersen et al 2010, Dong et al 2009, Elder et al 2010, Ozeki et al 2006, Hashimoto et al 2010, Xu et al 2007, Yang et al 2009, Henderson et al 2010, Price et al 2010, Bolland et al 2007,

			Conconi et al 2005
Трипсин	Разрезает пептидные связи с С-конца аргининовых и лизиновых остатков аминокислот	Длительная эксозиция приводит к разрушению ультраструктуры ВКМ	Brown et al 2010, Stern et al 2009, Wainwright et al 2010, Zhou et al 2010, Tudorache et al 2007, Schenke-Layland et al 2003, Kasimir et al 2003, Chen et al 2004
Диспаза	Специфически разрезает пептиды (фибронектин и коллаген IV)	Длительная эксозиция приводит к разрушению ультраструктуры ВКМ	Prasertsung et al 2001, Chen et al 2004, Hopkinson et al 2008
Хелатирующие агенты (EDTA, EGTA)	Связывают ионы металлов, нарушается адгезия клеток на ВКМ	Как правило используется в сочетании с биологическими агентами	Brown et al 2009, Prasertsung et al 2008, Elder et al 2010, Yang et al 2010, Kasimir et al 2003, Funamoto et al 2010, Hopkinson et al 2008, Ozeki et al 2006, Wainwright et al 2010, Sellaro et al 2010, Stern et al 2009, Yang et al 2009
Температура (замораживание-оттаивание)	Кристаллы льда разрушают клеточные мембраны	Образование кристаллов льда может разрушать ВКМ	Brown et al 2009, Prasertsung et al 2008, Elder et al 2010, Hopkinson et al 2008, Wainwright et al 2010, Sellaro et al 2010, Flynn et al 2010, Lehr et al 2010, Gulati et al 1988, Jackson et al 1988, Jackson et al 1990
Механическое разрушение	Прямое разрушение клеток	может разрушать ВКМ	Freytes et al 2008, Brown et al 2010, Wicha et al 1982, Sellaro et al 2010, Hopkinson et al 2008
Давление	Клетки лопаются, способствует удалению клеточного материала	может разрушать ВКМ	Sawada et al 2008, Hashimoro et al; 2010, Sasaki et al 2009, Hopkinson et al 2008, Funamoto et al 2010
Электропорация	Разрушение клеточных мембран	может разрушать ВКМ	Phillips et al 2010, Sano et al 2010
Технологии внесения агента			
Перфузия	облегчает контакт с химическими агентами или	может разрушать ВКМ	Shupe et al 2010, Price et al 2010, Sano et al 2010, Ross et al 2009,

	удаление клеточного материала		Cortiella et al 2010, Wainwright et al 2010, Ott et al 2010, Ott et al 2008, Uygun et al 2010, Petersen et al 2010
Градиент давления в ткани	облегчает контакт с химическими агентами или удаление клеточного материала	может разрушать ВКМ	Bolland et al 2007, Montoya et al 2009, Prasertsung et al 2008
Суперкритический поток	Приводит к лопанию клеток и облегчает контакт с химическими агентами или удаление клеточного материала	Применяемое давление может разрушать ВКМ	Sawada et al 2008
Перемешивание	Применяется для обработки химическим агентом или для удаления остатков клеточного материала	Активное перемешивание или соникация может разрушать ВКМ	Nakayama et al 2010, Brown et al 2009, Reing et al 2010, Elder et al 2010, Tudorache et al 2007, Cheng et al 2009, Xu et al 2008, Gorshevsky et al 2005, Ceborati et al 2010, Gui et al 2010, Hudson et al 2004, Gillies et al 2010, Borschel et al 2004, Baiguera et al 2010, Macchiarini et al 2008

Как правило, предварительно производят удаление излишка ткани для облегчения децеллюризации, при этом усилия направлены на сохранение базальной мембраны (Yang et al., 2010, Freytes et al., 2008). Применение механического давления также может способствовать децеллюризации (Brown et al., 2010, Wicha et al., 1982, Sellaro et al., 2010). Для тонких тканей, таких как мочевого пузыря, кишечника, перикард, амнион наиболее используемый метод – это замораживание-оттаивание с последующим удалением ненужных слоев ткани (мышц и подслизистой основы), короткой экспозицией с легкоотмываемым детергентом или кислотами и отмывкой агента. Для дермы может потребоваться более интенсивная биохимическая обработка и более длительные процедуры отмывки. Жирные, аморфные органы и ткани, такие как жировая ткань, мозг, поджелудочная железа требуют применения дополнительных липидных растворителей, например, спиртов. Сложность и длительность протокола децеллюризации пропорциональны требуемой биологической и геометрической сохранности. Время обработки является одним из критических параметров особенно для сложных органов и тканей. Так, протокол для децеллюризации тканей трахеи включает последовательные циклы обработки деоксихолатом и ДНКазой, при этом использование более 18 циклов снижает механические свойства ВКМ (Conconi et al., 2005).

Необходимым этапом подготовки ВКМ является его стерилизация или депирогенация для удаления эндотоксинов, и интактной вирусной или бактериальной ДНК, которая может присутствовать в препарате. Стерилизация может проводиться обработкой кислотами (Hodde et al., 2002) или растворителями (Gorschewsky et al., 2005), но эти методы не обеспечивают достаточной сохранности и могут повреждать ВКМ (Gorschewsky et al., 2005(2)). Кроме того, другие методы стерилизации, такие как обработка этиленоксидом, гамма-облучение также могут повреждать ВКМ (Freytes et al., 2008, Sun et al., 2008, Moreau et al., 2000, Gouk et al., 2008). Так, использование этиленоксида вызывает потерю механических свойств ВКМ (Rosario et al., 2008), но не во всех протоколах (Jackson et al., 1988, Freytes et al., 2008), кроме того этиленоксид провоцирует иммунный ответ хозяина после имплантации (Jackson et al., 1990). Гамма-облучение приводит к частичной денатурации белков, в частности коллагена, даже при низких дозах радиации (Sun et al., 2008), а некоторые липиды при данном методе стерилизации приобретают цитотоксичность (Moreau et al., 2000), также усиливается энзиматическая деградация ВКМ (Gouk et al., 2008). В качестве альтернативного метода стерилизации недавно была предложена обработка критическими концентрациями углекислого газа. На модели ВКМ кожи свиньи продемонстрировано минимальное изменение механических свойств (Qiu et al., 2009), однако, этот новый метод нуждается в дальнейшем тестировании на большем круге объектов.

Критическим моментом перед имплантацией является оценка качества полученного при децеллюризации каркаса, т.к. оставшиеся клетки или другой биологический материал могут привести к проблемам с заселением каркаса *in vitro* и иммунному отторжению в организме реципиента (Nagata et al., 2010, Manfredi et al., 2009, Brown et al., 2009, Zhang et al., 2010). Хотя процесс децеллюризации позволяет достичь 100% удаления клеток, необходимо оценивать количество других оставшихся компонентов: двуцепочечной ДНК, митохондрий, мембран-ассоциированных белков (фосфолипидов). Пороговые значения допустимых концентраций оставшихся компонентов остаются недостаточно изучены, потому что зависят от источника ВКМ, типа ткани и иммунного статуса реципиента. Определение стандартов оценки децеллюризации позволит провести сравнительную оценку протоколов, что крайне необходимо для разработки новых более эффективных модификаций.

Основываясь на совокупности данных о способности клеток заселять ВКМ и иммунном ответе реципиента, можно указать следующие примерные допустимые значения компонентов (Zheng et al., 2005):

- < 50 нг двуцепочечной ДНК на мг сухого веса ВКМ;
- < 200 п.н. длина оставшихся фрагментов ДНК
- отсутствие видимого ядерного материала при окраске на DAPI или HE.

Первый и второй критерии легко определяются с помощью коммерчески доступных интеркаляторов в дцДНК, таких как PicoGreen (Ahn et al., 1996), пропидиум йодид, бис-бензимид и методом электрофореза в геле. Третий критерий определяется в ходе стандартного гистологического окрашивания или методами иммунофлуоресценции, позволяющими количественное подтверждение первых двух критериев. Набор критериев несомненно должен быть расширен. Например, присутствие остаточных фосфолипидов может вызывать кальцификацию (Levy et al., 2003, Jorge-Herrero et al., 1994, Kim et al., 1976) и может быть количественно оценено энзиматическими методами (Takayama et al., 1977). Установление зависимости между степенью кальцификации и уровнем фосфолипидов приведет к установлению их допустимых остаточных концентраций.

Кроме оценки примесей биологических материалов в ВКМ, необходима оценка его механических свойств (Badylak et al., 2009). В настоящее время не существует единого мнения о влиянии процесса децеллюризации на механические свойства ВКМ. Имеются противоречивые данные о влиянии детергентов SDS и Тритона X-100 на свойства различных децеллюризованных тканей. Например, при использовании практически

идентичного протокола в разных работах докладывается как об уменьшении механических свойств в результате разрушения коллагена, так и о сохранении механических свойств (Woods et al., 2005, Cartmell et al., 2000). Существует также противоречие между данными о влиянии вымывания гликозаминогликанов на эластичность матрикса (Lovekamp et al., 2006, Mendoza-Novelo et al., 2010).

Таким образом, с одной стороны, необходимость свести иммуногенность к минимуму требует максимально эффективной децеллюризации, с другой стороны, все применяемые методы способны приводить к повреждению биологических и механических свойств ВКМ. Перспективы применения децеллюризованных ВКМ будут зависеть от выработки оптимальных методов, специфичных для каждой конкретной ткани.

Каркасы из синтетических биodeградируемых материалов

Альтернативным подходом в создании каркасов для роста клеток в тканевой инженерии является использование биodeградируемых материалов. В идеале биodeградируемые материалы должны выполнять каркасную функцию при имплантации органа и постепенно деградировать и замещаться естественным внеклеточным матриксом в процессе регенерации ткани. Большое распространение биodeградируемые материалы получили в тканевой инженерии сосудов.

Наиболее применяемым материалом является полигликолевая кислота (PGA), которая гидролизуеться по эфирной связи с образованием гликолевой кислоты, последняя в свою очередь метаболизируется и выводится в составе воды и углекислого газа. *In vivo* PGA теряет свои свойства в течение 4 недель и полностью абсорбируется за 6 месяцев. Скорость деградации может быть модифицирована присутствием сополимеров, таких как поли-L-лактид (PLLA), полигидроксиалканоат, поликапролактон-кополилактид, полиэтиленгликоль (Kim et al., 1998, Mooney et al., 1996, Wake et al., 1996). Было исследовано взаимодействие PGA с клетками *in situ* и *ex vivo*. В статье (Greisler et al., 1986) показано, что фибриллы, содержащие PGA, способствуют инфильтрации и пролиферации васкулярных клеток и росту капилляров, что активировало дальнейший поиск оптимальных соотношений PGA и сополимеров (Yu et al., 1993, Yu et al., 1994), изделия из которых тестировались *ex situ* (Mooney et al., 1994, Fidkowski et al., 2005, Niklason et al., 1999), т.к. прослеживание поведения изделия в организме *in vivo* затруднено.

Другой распространенной группой материалов являются полигидроксиалканоаты - линейные полимеры, которые образуются при бактериальной ферментации сахаров или липидов. Отличительная особенность материалов этой группы заключается в возможности модификаций для получения широкого спектра значений скорости деградации и механических параметров. Шум-Тим с соавторами получили биоинженерную аорту на полимерном каркасе из PGA и полигидроксиоктаноата (PHO), который был заселен клетками сонной артерии быка (Shum-Tim et al., 1999). Внутренний слой каркаса был выполнен из PGA фибрилл, а внешний из PHO, содержащего нанопоры. Внутренний слой способствовал заселению клетками и образованию внеклеточного матрикса, а гидролизующийся с меньшей скоростью внешний слой обеспечивал механическую стабильность импланта. Гистологический анализ через 5 месяцев после экспериментальной имплантации показал образование фибрилл коллагена и эластина, направление которых соответствовало току крови.

Более спорным является применение поликапролактона (PLC). Этот материал обладает малой скоростью гидролиза эфирной связи, продукты гидролиза утилизируются макрофагами и глиальными клетками с возможным возникновением воспалительной реакции. В работах Shin'oka с соавторами использовалось заселение каркаса из поликапролактона как клетками венозных сосудов (Shinoka et al., 1998, Watanabe et al., 2001, Shin'oka et al., 2001), так и стволовыми мезенхимальными клетками (Shin'oka et al.,

2001(2), Matsumura et al., 2006) с достаточно удовлетворительными клиническими результатами.

Применение биodeградируемых материалов дает возможность использования различных ростовых факторов и факторов дифференцировки, которые постепенно высвобождаются в организме по мере деградации полимерного материала. Например, в двух работах было показано, что постепенное высвобождение VEGF и FGF-2 из имплантов на основе сополимера из PGA-PLLA и полиуретан-мочевины соответственно способствовало ангиогенезу *in situ* (Ennett et al., 2006, Guan et al., 2007).

Развитие нанотехнологий обеспечило создание материалов каркасов, которые способны мимикрировать ультраструктуру нативного внеклеточного матрикса и одновременно обеспечивать необходимые биологические и механические свойства.

Один из подходов заключается в производстве нанофибрилл методом электропиннинга из уже зарекомендовавших себя природных и синтетических полимеров (Lee et al., 2007, Strankus et al., 2007, Barnes et al., 2007, Pham et al., 2006). Преимущество каркасов, полученных данным методом, заключается в высокой степени пористости и большой площади поверхности, которые стимулируют естественное клеточное покрытие и образование нативного внеклеточного матрикса (de Mel et al., 2008, Li et al., 2004, He et al., 2005).

Другой подход состоит в использовании наночастиц в качестве добавок к основному полимерному материалу, что позволяет существенно улучшить механические свойства изделия (Kannan et al., 2006, Endo et al., 2005, Meng et al., 2005).

Ярким примером успешного применения нанокompозитных материалов в тканевой инженерии является использование POSS-PCU (polyhedraloligomeric silsesquioxane-poly(carbonate-urea)urethane) при создании биоинженерного каркаса дыхательных путей (Jungebluth P. et al., 2011). Данный материал обладает несомненными преимуществами, так является одобренным для применения в клинике, и имеется опыт его применения в хирургической практике в качестве импланта протоков слезных желез и шунтирования крупных сосудов. Смешанный состав полимера обеспечивает как необходимый уровень прочности, предотвращающий коллапс просвета, так и значительную пористость, имитирующую матрикс соединительной мышечной ткани (Ahmed et al., 2011).

Применение искусственных каркасов из синтетических биodeградируемых материалов в тканевой биоинженерии обладает рядом преимуществ, которые сведены в табл.2 и по всей видимости получит широкое распространение в самом ближайшем будущем.

Табл. 2. Сравнение каркасов для биоинженерных органов, полученных из донорского материала и искусственных полимеров (цитируется по Jungebluth P. et al., 2011 с поправками).

Свойства	Естественный материал	Искусственные полимеры
Материал	Может быть иммуногенным	Выбираются неиммуногенные материалы
Механические свойства	Биомеханическая стабильность после имплантации может быть нарушена	Могут быть подобраны биомеханические свойства (прочности, упругости, пористости), необходимые для конкретного целевого органа
Размеры и пространственные параметры	Зависят от донорского материала	Могут быть созданы с точно заданными рамерами, идеально соответствующие органу реципиента
Возможность	Высокая, существует во	Производство может быть

бактериального заражения	время забора донорского материала и <i>in vitro</i> манипуляций	выполнено по GMP стандарту, изделие может быть простерилизовано
Адгезия клеток	Является естественным матриксом для клеток	Пористость и специальные пептидные покрытия могут обеспечить имитацию естественного матрикса, достаточную для заселения клетками
Среднесрочные и долгосрочные исходы	Малопредсказуемы в следствии природы донорского материала	Более предсказуемы в результате стандартизации процесса изготовления
Необходимость донорского материала	Есть	Нет
Время изготовления	3 недели	2 дня
Стоимость	16 000 евро	2500 евро

Выбор клеток для тканевой инженерии органов

Основная идея клеточной терапии заключается в инъекции или имплантации на каркасе-носителе здоровых клеток, которые бы могли заместить популяцию поврежденных клеток организма, не способных выполнять свои функции, при этом внесенные клетки могут способствовать активизации стволового регенеративного потенциала самого реципиента. Применяемые клетки могут принадлежать этому же индивидууму (аутогенные), иммуносовместимому донору (аллогенные), а также в редких случаях другому виду (гетерологичные). При этом аутогенные клетки являются наиболее предпочтительными (Yoo et al., 1998, Amiel et al., 1999, Yoo et al., 1999, Atala et al., 1998, 1999, 2001, Oberpenning et al., 1999), потому что, хотя и могут вызвать воспалительный ответ, не вызывают иммунного отторжения органа. Другая классификация клеток относится к их происхождению. По этому принципу клетки делятся на нативные (полученные при биопсии ткани и дальнейшем культивировании *ex vivo*) и полученные из стволовых клеток в процессе дифференцировки в ответ на экзогенные и эндогенные биохимические сигналы.

Нативные клетки

Нативные клетки для тканевой инженерии получают из небольших фрагментов ткани донора, которые диссоциируют до отдельных клеток, затем клетки наращивают *ex vivo* и заселяют ими каркас. Наибольшая проблема и ограничение метода заключаются в невозможности в настоящее время получить и/или нарастить специализированные клетки в достаточном количестве, т.к. дифференцированные клетки имеют ограниченный пролиферативный потенциал. Эта проблема касается даже органов, которые имеют высокий регенеративный потенциал *in vivo*, например, печени. Изучение сигналов, направляющих или запрещающих дифференцировку, может помочь преодолеть эту проблему. Например, уретральные клетки можно культивировать *in vitro*, но они имеют очень ограниченный пролиферативный потенциал. В нескольких лабораториях были разработаны протоколы, которые идентифицировали недифференцированные клетки и поддерживали их в недифференцированном состоянии во время фазы роста (Cilento et al., 1994, Scriven et al., 1997, Liebert et al., 1997, Puthenveetil et al., 1999), что позволило увеличить площадь наращиваемой культуры с 1 см² до 4202 м² за 8-ми недельный срок (Cilento et al., 1994). Как уже отмечалось, предпочтительно использовать аутогенные клетки, но они не всегда могут быть получены в достаточном количестве и удовлетворительного качества у пациентов в критических состояниях, поэтому применение нативных клеток носит ограниченный характер.

Стволовые клетки

Эмбриональные стволовые клетки

Эмбриональные стволовые клетки человека способны к пролиферации в недифференцированном плюрипотентном состоянии, а также к дифференцировке в различные типы специализированных клеток (Brivanlou et al., 2003). Они могут быть изолированы из внутренней клеточной массы эмбриона на стадии бластоцисты (на 5-ый день после оплодотворения). Культивирование эмбриональных стволовых клеток человека осуществляется на фидерном слое из эмбриональных фибробластов мыши или слое фидерных клеток человека (Richards et al., 2002). Также разработаны методы культивирования без фидерного слоя, который может быть источником вирусных мышиных и человеческих инфекций (Amit et al., 2004). Современные протоколы позволяют проводить до 80 пассажей клеток (Reubinoff et al., 2000). Эмбриональные стволовые клетки человека способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листов *in vitro*: эктодермы (кожа, нервы (Reubinoff et al., 2001, Schuldiner et al., 2001, Schuldiner et al., 2000, Zhang et al., 2001)), мезодермы (кровь, клетки миокарда, хрящи, эндотелиальные клетки, мышцы (Kaufman et al., 2001, Kehat et al., 2001, Levenberg et al., 2002)), энтодермы (клетки поджелудочной железы (Assady et al., 2001)). В подтверждение своей плюрипотентности эмбриональные стволовые клетки человека могут формировать эмбриоидные тельца (клеточные агрегаты, состоящие из трех зародышевых листов) *in vitro*, а также образовывать тератомы *in vivo* (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Т к использование зародышей человека в медицинских целях имеет серьезные этические проблемы, использование эмбриональных стволовых клеток человека запрещено во многих странах.

Стволовые клетки, полученные при переносе ядра соматических клеток

Метод заключается в переносе соматического диплоидного ядра в яйцеклетку. Впервые возможность соматического клонирования была продемонстрирована на лягушках (Gurdon et al., 1958), но в этих классических экспериментах использовали клетки позднего эмбриона. Овца Долли была первым животным, для клонирования которого использовали ядро взрослой ткани (Campbell et al., 1996, Wilmut et al., 1997). В дальнейшем соматическое клонирование было выполнено на ряде животных: корова (Cibelli et al., 1998), коза (Baguisi et al., 1999), мышь (Wakayama et al., 1998), свинья (Bethhauser et al., 2000, De Sousa et al., 2002). Существует два принципиально различающихся метода соматического клонирования (Colman et al., 2000, Vogelstein et al., 2002): репродуктивное и терапевтическое. Запрещенное для человека репродуктивное клонирование используется для образования эмбриона с генетическим материалом, идентичным донору ядра, с последующей подсадкой эмбриона в матку. Терапевтическое клонирование направлено на получение ранних эмбриональных стадий с последующим получением эмбриональных клеточных линий. Не являясь этически бесспорным, этот метод терапевтического клонирования не запрещен (Lanza et al., 2001, Lanza et al., 1999) и имеет преимущество, т к исключает иммунное отторжение органа, полученного из таких клеток. Недостаток метода заключается в крайне низкой эффективности соматического клонирования (Rideout et al., 2001, Solter et al., 2000, Hochedlinger et al., 2002).

Индукцированные плюрипотентные клетки (ИПК)

Индукцированное репрограммирование заключается в дедифференцировке соматических клеток взрослого организма, например, фибробластов в плюрипотентные аутогенные клетки. В работе Йаманака с соавторами тестировали 24 гена на способность вызывать репрограммирование мышинных взрослых и эмбриональных фибробластов в плюрипотентные клетки (Takahashi et al., 2006). В результате были найдены 4 гена *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*, экспрессия которых в составе ретровирусных векторов, приводила к

появлению клеток со свойствами стволовых. Полученные клетки имели черты самообновляющихся эмбриональных стволовых клеток, экспрессировали специфические маркеры эмбриональных стволовых клеток и образовывали эмбрионидные тельца *in vitro* и тератомы *in vivo*. При инъекции ИПК в бластоцисту они давали начало различным клеточным линиям. Однако, хотя ИПК являются плюрипотентными, они не идентичны эмбриональным стволовым клеткам, химеры, произведенные из ИПК, не вынашиваются полноценно. От эмбриональных стволовых клеток ИПК отличают паттерны экспрессии и эпигенетических модификаций генома, что говорит о незаконченном репрограммировании. Сразу после открытия ИПК и до настоящего времени ведутся исследования, направленные на повышение эффективности репрограммирования для достижения большего функционального сходства с эмбриональными стволовыми клетками. Уже в работе 2007 г Вернинга и Женича (Wernig et al., 2007) были получены ИПК, у которых паттерны метилирования ДНК, экспрессии генов и состояние хроматина были близки таковым у эмбриональных стволовых клеток. Также ИПК, полученные в данной работе были способны производить жизнеспособные химеры, а также давать начало клеткам зародышевого пути, что свидетельствует о более полном процессе репрограммирования. В ходе данной работы было сделано наблюдение, что число репрограммированных колоний растет с увеличением времени между индукцией и селекцией (20 дней вместо 5), это позволяет думать, что процесс репрограммирования протекает достаточно медленно (Takahashi et al., 2007, Yu et al., 2007). Хотя репрограммирование клеток является интересным феноменом, недостаточное понимание механизмов этого процесса ограничивает его применение в тканевой инженерии органов.

Клетки амниотической жидкости и плацентарные стволовые клетки

Плацента и амниотическая жидкость являются альтернативными источниками стволовых клеток, они содержат множество частично дифференцированных клеток, ведущих происхождение от плода. Были разработаны протоколы изолирования популяций стволовых клеток из плаценты и амниотической жидкости. Установлено, что клетки этих популяций несут маркеры как эмбриональных, так и взрослых стволовых клеток (De Coppi et al., 2007). Недифференцированные клетки способны к быстрому размножению без фидерного слоя с временем удвоения популяции 36 часов. Такие клетки не способны к формированию тератом *in vivo*, однако, на протяжении по крайней мере 250 клеточных циклов поддерживали длинные теломеры и нормальный кариотип. Клетки, полученные из плаценты и амниотической жидкости способны дифференцироваться в широкий спектр клеточных линий (мультипотентны): адипогенные, остеогенные, миогенные, эндотелиальные, нейрональные, гепатические клеточные линии. Можно привести несколько примеров специализированных линий, полученных при дифференцировке *in vitro* стволовых клеток амниотической жидкости, которые могут быть использованы в тканевой инженерии: нейрональная линия клеток, секретирующая нейротрансмиттер L-глутамат и экспрессирующая специфические белки GIPK калиевых каналов; линия печени, продуцирующая мочевины; остеогенная линия, способная к формированию костей. Для широкого клинического применения клетки могут быть получены при амниоцентезе развивающегося плода или из плаценты в момент рождения. Важным преимуществом является возможность их консервации в банках, коллекции которых позволяют подобрать наиболее близкий по гистосовместимости вариант для получения импланта с клеточным покрытием (De Coppi et al., 2007).

Стволовые клетки взрослого организма

Быстрое обновление клеток крови, эпителия кишечника происходят в течение всей жизни взрослого организма за счет активности стволовых клеток кроветворения (гематопэтических) и стволовых клеток эпителия кишечника (Ballas et al., 2002). Стволовые клетки, которые участвуют в поддержании и регенерации ткани были обнаружены в

других органах взрослого организма: мозге (Jiao et al., 2008, Taupin et al., 2006), коже (Jensen et al., 2008), мышцах (Crisan et al., 2008), а также в других органах (Weiner et al., 2008). Возможность применения аутогенных стволовых клеток несомненно заслуживает внимания, тем не менее, прогресс в изучении и применении тканеспецифичных стволовых клеток очень ограничен из-за малого количества клеток, которое может быть выделено (Mimeault et al., 2008, Hristov et al., 2008) и их низкого пролиферативного потенциала, а также трудностей культивирования. Стволовые мультипотентные клетки взрослого организма могут быть получены из жировой ткани, эти клетки могут выделяются в большем количестве, чем другие типы взрослых стволовых клеток, и поэтому нашли применение в тканевой инженерии тканей. В настоящее время зарегистрировано несколько клинических исследований с их применением (Wilson et al., 2011, Mizuno et al., 2010).

Наибольший интерес для тканевой инженерии представляют мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые находятся в строме костного мозга (Devine et al., 2002, Jiang et al., 2002). Эти клетки мультипотентны и могут быть дифференцированы в клетки различных тканей: нейрональные (Duan et al., 2007), жировые (Crisan et al., 2008), мышечные (Crisan et al., 2008, Luttun et al., 2006), клетки печени (Mimeault et al., 2008, Ikeda et al., 2008), легких (Nolen-Walston et al., 2008), селезенки (in't Anker et al., 2003), кишечника (Jiang et al., 2002), за исключением клеток костного мозга и гонад. МСК, пожалуй, единственный тип стволовых клеток взрослого организма, который успешно культивируется *in vitro*.

Выращивание органа *ex vivo*

Как уже отмечалось выше, основная идея тканевой инженерии – выращивание органа «в лаборатории», в ходе которого в условиях биореактора на каркасе из биосовместимого материала культивируют дифференцированные или стволовые клетки.

Биореакторы – это собирательное понятие, которое обозначает устройства для культивирования клеток от простых трубок для проточной перфузии до сложных 3D устройств в зависимости от целевого органа. Развитие биореакторов идет по направлению увеличения сложности для создания комплексных многоосевых 3D конструкций (Naing et al., 2009, 2010). Биореакторы контролируют скорости потоков перфузионных растворов, температуру, состав газовой смеси, давление и механические нагрузки на культуру клеток и снабжаются датчиками или устройствами, позволяющими отслеживать состояние клеток (Naing et al., 2010, Conrads et al., 2010). При выращивании полых органов современные биореакторы позволяют разделять внутриллюминальные и экстраллюминальные компартменты (Macchiarini et al., 2008, Asnaghi et al., 2009).

В каждом конкретном случае должны быть подобраны специфические условия культивирования. Например, при выращивании хрящевой ткани было показано, что определенный паттерн динамического ламинарного потока является предпочтительней турбулентного или статического способа культивирования (Khayyeri et al., 2010). При выращивании остеобластов определенное преимущество дает циклическая компрессия, проводимая в физиологических пределах (Jung et al., 2008). Остеобласты, выращиваемые на матриксе положительно реагируют на компрессию (David et al., 2008), а остеобласты, выращиваемые в отсутствии матрикса лучше пролиферируют в биореакторах с ротацией (Wang et al., 2007).

Успех выращивания в биореакторе во многом зависит от правильно выбранного каркаса для прикрепления специфического типа клеток (Naing et al., 2010), т.к. ни один из применяемых каркасов не воспроизводит естественных внеклеточный матрикс полностью (Yamada et al., 2003). Каким образом тот или иной каркас будет определять поддержание клеточной морфологии, скорости пролиферации и миграции в конкретных условиях биореактора необходимо устанавливать экспериментально. Например, Кукурман с соавторами (Cukierman et al., 2001) показали, что децеллюризованный ВКМ обеспечивает

в два раза более высокую скорость пролиферации, чем коллагеновые матрицы в применяемых ими условиях в биореакторе.

Контролируемые условия культивирования в биореакторе позволяют добавлять биологически-активные компоненты, увеличивающие жизнеспособность клеток. Например, при выращивании на матриксе культуры гепатоцитов хорошую эффективность показало добавление в камеру биореактора носителя кислорода на гемоглобиновой основе для увеличения снабжения клеток кислородом (Sullivan et al., 2008).

При использовании недифференцированных стволовых клеток возможно добавление в культуральную среду факторов роста и дифференцировки. Так, при получении тканеинженерной трахеи из МСК использовали рекомбинантные или синтетические аналоги трансформирующего фактора роста человека TGF-beta3, G-CSF (колоний-стимулирующий фактор роста гранулоцитов) и эритропоэтин (Jungebluth P. et al., 2011).

Клинические примеры комплексного применения подходов тканевой инженерии

При большом количестве экспериментальных работ по тканевой инженерии органов, количество клинических случаев остается ограниченным. Приведем несколько примеров.

Уретра.

В работе 2011 года Райя-Ривера с коллегами доложили о создании тканеинженерной уретры, полученной из собственных клеток пациента. Это предварительное исследование проводилось у 5 мальчиков с дефектами уретры. Из препаратов тканевой биопсии были получены мышечные и эпителиальные клетки, которые наращивались и засеивались на каркас из биodeградируемого материала сополимера полилактида и полигликолида. Затем была выполнена хирургическая операция, направленная на реконструкцию уретры с использованием тканеинженерного импланта. Пациенты были прослежены на протяжении 6 лет. Радиографические и эндоскопические исследования показали, что просвет протока сохранялся и развития стриктур не происходило. Биопсия через 3 месяца после операции выявила нормальную архитектуру ткани, состоящей из мышечного и эпителиального слоев (Raya-Rivera et al., 2011).

Мочевой пузырь.

Первый клинический случай применения тканевой инженерии для реконструкции мочевого пузыря был инициирован в 1999 году. В небольшом пилотном исследовании были задействованы 7 пациентов. Сравнивался каркас из коллагена с салником в качестве покрытия или без покрытия, а также коллаген с добавлением и без добавления PGA. Во всех случаях каркас заселялся клетками (Atala et al., 2006). В качестве клеток также были использованы аутогенные клетки, полученные при биопсии мочевого пузыря. Наиболее удовлетворительные функциональные и механические свойства были установлены для каркаса коллаген-PGA, засеянного клетками.

Сосуды.

Тканеинженерный сосудистый имплант был получен из аутологических васкулярных клеток, выращенных в культуре и заселенных на биodeградируемый каркас из поликапролактон-полилактида (Shin'oka et al., 2001). Получившийся аутологичный искусственный сосуд был имплантирован на место сонной артерии. Через 7 месяцев после имплантации остатки каркаса или следы аневризма обнаружены не были. Другая группа исследователей использовала многослойные клеточные слои для создания сосудов, которые были использованы при проведении гемодиализа (L'Heureux et al., 2007, McAllister et al., 2009).

Трахея.

В 2008 году доктору Маккиарини с коллегами удалось получить искусственную трахею из аутологических клеток пациента на децеллюризованном ВКМ, взятом от донора (Macchiarini et al., 2008). Полученный орган был использован для замены левого главного

бронха. Осложнений в постоперационный период не возникло, и через 3 месяца у пациента нормальная легочная функция. В 2011 году этой же группе удалось получить и имплантировать орган из аутологичных МСК на нанокompозитном биodeградируемом каркасе (Jungebluth et al., 2011).

Заключение

Тканевая инженерия органов является перспективным разделом регенеративной медицины, направленным на создание живых функциональных аналогов органов и необходимым для лечения многих серьезных заболеваний. В настоящее время методы тканевой инженерии находятся скорее на экспериментальной стадии выбора материалов для создания каркасов, разработки методик методов подготовки, заселения каркасов, выбора и подготовки клеток для заселения, а также проходят опробирование в выборочных клинических случаях. Для введения в широкую клиническую практику необходимы как дополнительные экспериментальные данные, так и расширенные клинические исследования. Остаются и нерешенные проблемы, например, создание органов, состоящих из многих типов клеток (почки) или органов большого размера (печень). Также недостаточно изучены процессы и сигнальные пути, включающиеся при регенерации органа при имплантации тканеинженерного органа. Их изучение, возможно, приведет к созданию «умных имплантов», содержащих специфические биомолекулы, стимулирующие процесс регенерации. Однако, первые успешные примеры имплантации органов, полученных методами тканевой инженерии, позволяют надеяться, что широкое клиническое применение тканеинженерных органов будет возможно в ближайшем будущем.