

**Обзор литературы по методам исследования процессов выделения клеток, их дифференцировки, пролиферации, размножения, создания клеточных линий, экспрессии генов в процессе дифференцировки стволовых клеток, взаимодействия с различными каркасами – натуральными и синтетическими, децеллюризации тканей и органов, использованию биореакторов (на примере органов дыхательной системы)**

## **Содержание**

1. Введение
2. Методы исследования процессов пролиферации и дифференцировки эндогенных прогениторных и стволовых клеток дыхательного эпителия
3. Методы использования экзогенных стволовых клеток для регенерации органов дыхательной системы
  - 3.1. Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК)
  - 3.2. Использование стволовых клеток взрослого организма
4. Методы анализа экспрессии генов стволовых клеток и клеток в процессе дифференцировки
  - 4.1. Отдельные маркеры и их сочетания для характеристики стволовых клеток и стадии дифференцировки
  - 4.2. Использование профилей экспрессии для характеристики стволовых клеток и стадии дифференцировки
5. Использование каркасов и биореакторов при выращивании легких и органов дыхательных путей

## **1. Введение**

Болезни легких и дыхательных путей занимают одну из лидирующих позиций по частоте встречаемости и уровню смертности. В данный момент около 50 млн. человек в мире страдают заболеваниями легких в терминальной стадии. В 2020 году по оценкам ВОЗ 11.9 млн. смертей из 68 млн. будут вызваны заболеваниями легких. Несмотря на некоторые достижения в лечении симптомов заболеваний аллотрансплантация является по-прежнему единственным эффективным решением проблемы. Однако, к сожалению, этот метод связан с серьезными проблемами – нехваткой донорских органов и высокой частотой осложнений при подобных трансплантациях, а также – долговременными побочными эффектами, связанными с необходимостью иммуносупрессии.

Таким образом, парадигма трансплантации и терапии при подобных заболеваниях должна быть радикально изменена. Недавние открытия в этой области свидетельствуют, что легкие и органы дыхательных путей человека могут быть восстановлены на клеточном уровне при использовании как тканевой инженерии, так и клеточной терапии.

В связи с этим большие надежды, которые возлагаются на развитие методов клеточных технологий в применении к восстановлению органов дыхательной системы, требуют проведения углубленных исследований механизмов дифференцировки, пролиферации, размножения, создания клеточных линий, экспрессии генов в процессе дифференцировки стволовых клеток, а также - взаимодействия клеток с различными каркасами (натуральными и синтетическими). Результаты этих исследований будут рассмотрены в данном обзоре.

## **2. Методы исследования процессов пролиферации и дифференцировки эндогенных прогениторных и стволовых клеток дыхательного эпителия**

Скорость обновления ткани является основной характеристикой ее регенеративного потенциала. Для количественного измерения скорости обновления

применяют непрямые методы измерения клеточной пролиферации, которые основаны на измерении включения меченых ДНК предшественников, таких как бромдезоксисуридин (BrdU) и [<sup>3</sup>H]-тимидин, в клеточную ДНК в S-фазе клеточного периода. Существует две группы методов, использующих импульсное или продолжительное введение метки. С помощью импульсного мечения было установлено, что пролиферирующие клетки составляют 1,3% в эпителии трахеи (Borthwick et al., 2001) и 0,06% в бронхиальном эпителии (Reynolds et al., 2000). В дополнении к импульсному мечению, продолжительное мечение также показало, что обновление бронхиального эпителия составляет 1% в день (Hong et al., 2001).

Прямой метод измерения времени полужизни определенного типа клеток основан на прослеживании судьбы конкретных клеток (см. ниже). Время полужизни реснитчатых клеток дыхательного эпителия, определенное таким образом, составило 6 и 17 месяцев для трахеи и бронхов соответственно (Rawlins et al., 2008). Вследствие экспериментальных трудностей ни один из этих методов не позволяет напрямую оценить скорость деления Клара клеток.

Тем не менее, становится понятно, что скорость обновления дыхательного эпителия сходна со скоростью обновления эндокринной части поджелудочной железы (Teta et al., 2005), но существенно меньше скорости обновления эпителия тонкого кишечника, что подразумевает фундаментальные отличия в регуляции прогениторных клеток в медленно и быстро обновляющихся органах (Stripp, 2008).

Прогениторными принято называть клетки, которые включают меченые предшественники ДНК в ответ на повреждение ткани. Для поиска прогениторных и стволовых клеток дыхательных путей были использованы *in vivo* модели, в которых применялись различные повреждающие агенты: детергенты, например, полидоканол (Borthwick et al., 2001), токсические газы, озон (Evans et al., 1976), диоксид азота (Evans et al., 1976, Stripp et al., 1995), диоксид серы (Borthwick et al., 2001), токсические вещества, нафталин (Stripp et al., 1995), механическое повреждение (Shimizu et al., 1994). Другой метод внесения повреждений – тканеспецифичная активация цитотоксических генов у трансгенных мышей (Snyder et al., 2009, Rawlins 2008, Rawlins and Hogan 2006, Chen et al., 2009, Liu and Engelhardt 2008).

Для идентификации и характеристики прогениторных клеток применяют методы прослеживания клеточной судьбы и методы функциональной оценки в составе реконструированной ткани.

Традиционный ретровирусный анализ прослеживания клеточной судьбы состоит в выделении первичной культуры клеток и ее заражении ретровирусами, неспособными к самостоятельному размножению, но несущими репортерный ген. При условии тщательной трипсинизации при получении первичной культуры, в дальнейшем можно исходить из допущения, что каждый клон клеток, содержащих репортерный ген, представляет собой клональную экспансию одной клетки (Engelhardt et al., 1995). В более поздних работах исследователи прослеживали судьбы прогениторных клеток *in vivo* при помощи Cre/Lox системы активации репортерного гена (Hong et al., 2004 a,b). Исходно репортерный ген неактивен из-за присутствия в его составе дополнительного ДНК фрагмента, окруженного сайтами lox для сайт-специфической рекомбиназы Cre. Cre рекомбиназа находится под контролем индуцибельного промотора, активируемого при добавлении синтетического стероида томаксифена. При добавлении томаксифена активированная рекомбиназа осуществляет рекомбинацию по lox сайтам, вырезая фрагмент из репортерного гена, в результате получается функциональная копия гена. Событие происходит статистически в некоторых клетках, судьба которых и судьба их потомков могут быть прослежены в дальнейшем по работе репортерного гена.

Методы функциональной оценки в составе реконструированной ткани выполняются на ксенографтах и состоят в заселении поврежденного органа исследуемыми клетками. Например, трахея мыши, с которой удален эпителиальный слой, заселяется популяцией эпителиальных клеток дыхательного эпителия человека, и проводится имплантация этой трахеи бестимусным мышам. Затем оценивается скорость эпителизации и проводится гистологическое исследование структуры образующегося эпителиального слоя (Engelhardt et al., 1992 a, b).

С помощью совокупности этих подходов были выявлены различные субпопуляции базальных клеток дыхательного эпителия, которые различаются по

своим пролиферативным способностям, потенциалу к дифференцировке и образованию клонов (Borthwick et al., 1999, 2001, Engelhardt et al., 1992).

В трахее, главных ветвях и субмукозных железах главных ветвей прогениторными свойствами обладает субпопуляция базальных эпителиальных клеток, которые экспрессируют p63 и цитokerатины 5 и 14. У мышей в дыхательных путях меньшего диаметра присутствуют Клара-клетки, которые в ответ на повреждение начинают усиленно делиться с образованием реснитчатых эпителиальных клеток. Однако, в отличие от постоянно и быстро делящихся клеток-предшественников других эпителиальных тканей, например, кишечника, Клара клетки в норме имеют низкий пролиферативный потенциал, широко рассеяны по бронхиальному эпителию и выполняют специфические клеточные функции. В еще более дистальных бронхах была найдена субпопуляция Клара-клеток, которые устойчивы к токсину нафталину (блокирующему специфическую изоформу цитохрома P450, которая присуща Клара-клеткам), и обладает свойствами прогениторных клеток, в связи с чем рассматривается как популяция бронхиальных стволовых клеток (Chen et al., 2009). Нафталин-устойчивые клетки также найдены в специфических микроокружениях: нейроэпителиальных тельцах и бронхиоальвеолярных соединениях (Snyder et al., 2009, Chen et al., 2009).

В районах бронхиоальвеолярного соединения в легких мышей была обнаружена популяция нафталин-устойчивых Клара-клеток, которые не только красятся на специфический маркер Клара-клеток (CCSP – Clara cell secretory protein), но и на маркер АЕС II (pro-SPC – pro-surfactant protein C) (Kim et al., 2005). Были описаны ситуации, в которых данный тип клеток пролиферировал в ответ на повреждения и во время компенсаторного роста при удалении одного из легких (Nolen-Walston et al., 2008). Кроме того, при изоляции клеток с двойным положительным окрашиванием на pro-SPC и CCSP некоторые клетки проявляли уникальный поверхностный фенотип Scal1+/CD34+/CD45-/CD31-. Эти клетки самообновлялись в культуре и давали начало клеткам pro-SPC/CCSP и АЕС I (aquaporin 5+). Таким образом, данные клетки могут рассматриваться как стволовые бронхиоальвеолярные клетки (BASCs) (Kim et al., 2005).

Ранее делались попытки выделения стволовых клеток по критерию неударживания красителя Hoechst (Giangreco et al., 2004), но в дальнейшем этот критерий был откинут (Reynolds et al., 2007).

Вследствие применения исследователями различных методик существует некоторая двусмысленность данных, и нельзя исключать, что токсин-устойчивые Клара клетки, VACS и другие клеточные линии представляют собой различные интерпретации одной и той же клеточной популяции (Snyder et al., 2009). Ясность можно внести, существенно расширив спектр специфических маркеров различных клеточных популяций. Примером работы в этом направлении является исследование экспрессии Sc $\alpha$ 1 (стволового клеточного антигена 1). Ранее считалось, что она является исключительным признаком мышинных гематопоетических клеток, но в настоящее время показана экспрессия Sc $\alpha$ 1 в бронхиолярных предшественниках и клетках предшественников фибробластов в легких (Teisanu et al., 2009, McQualter et al., 2009, 2010).

Существенно меньше информации о предшественниках клеточных популяций промежуточных (интерстициальных), мышечных и эндотелиальных клеток легкого (McQualter et al., 2009, Murphy et al., 2008). Недавно несколькими группами исследователей были обнаружены резидентные мезенхимальные стволовые клетки в легких мыши, а также в легких новорожденных и взрослых людей (Hennrick et al., 2007, Lama et al., 2007, Karoubi et al., 2009). В настоящее время остается непонятным, участвуют ли эти клетки репарации легочной ткани или только в иммунной защите органа.

Исследования молекулярных механизмов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток дыхательного эпителия в основном проводятся методами генетических вмешательств (нокаут, нокдаун, эктопическая экспрессия), затрагивающих предположительно значимые компоненты сигнальных путей или молекулы, известные как регуляторы развития легких и канцерогенеза: канонический Wnt-сигналинг, сигнальные пути через MAP-киназу и Ras, PTEN, GATA-6, Bmi1. В качестве примера ниже приведен ряд работ, посвященных молекулярным механизмам пролиферации и дифференцировки стволовых клеток дыхательного эпителия.

Эктопическая активация Wnt-сигналинга, K-Ras сигналинга или удаление на определенной стадии развития GATA-6, PTEN, PI3 киназы, p38 $\alpha$  MAP киназы, все эти вмешательства приводили к увеличению количества CCSP/Pro-SPC позитивных клеток (Kim et al., 2005, Reynolds et al., 2008, Zhang et al., 2008, Ventura et al., 2007, Jackson et al., 2001, Yanagi et al., 2007, Dovey et al., 2008, Yang et al., 2008, Tiozzo et al., 2009).

Даниэли с соавторами установили, что ген опухолевого супрессора p63 экспрессируется в базальном слое клеток развивающейся трахеи, но экспрессия падает у более специализированных клеток (Daniely et al., 2004). На этом основании был сделан вывод о том, что данный ген вовлечен в формирование стратифицированного эпителия (Koster et al., 2004, Senoo et al., 2007).

Нокаутные мыши по гену Nog, кодирующему антагонист Vmp, имели нарушения ветвления воздушных путей, но дефект пропадал при одновременном уменьшении дозы гена Vmp4 (Que et al., 2006). Присутствие функциональных копий Sox2 также необходимо для ветвления бронхов (Gontan et al., 2008). Исследования роли гена Sox2 (Que et al., 2009) были выполнены на мутантах, в которых ген был удален в вентральном эпителиальном домене раннего кишечника, который дает начало трахее и легочным пузырькам. Все мутанты умирали от респираторного стресса при рождении, так как имели укороченную трахею. Делеция гена в культуре эпителиальных клеток уменьшает пролиферативную способность клеток, делеция *in vivo* во взрослом эпителии уменьшает способность к репарации после повреждений, что свидетельствует о роли Sox2 в поддержании взрослого эпителия дыхательных путей.

Эктопическая гиперэкспрессия гена Sox17 в клетках взрослого дыхательного эпителия приводила к уменьшению экспрессии ингибиторов клеточного цикла (p15, p21, p57), активируя пролиферацию и реинициацию мультипотентного состояния прогениторных клеток взрослого легкого (Lange et al., 2009). Делеция Notch гена в эпителии развивающегося легкого приводит к образованию исключительно реснитчатых клеток и отсутствию Клара клеток, что свидетельствует о роли Notch-сигналинга в определении направления конечной дифференцировки в дыхательном эпителии (Tsao et al., 2009).

Таким образом, методы оценки скорости пролиферации, прослеживания судьбы клеток, функциональной оценки клеток в составе поврежденного органа и методы фенотипической идентификации клеток при помощи антител к поверхностным маркерам позволили выделить и охарактеризовать несколько типов эндогенных клеток дыхательного эпителия, участвующих в развитии органа и репарации повреждений. Также постепенно становятся понятны некоторые молекулярные детали и сигнальные пути, задействованные в пролиферации и дифференцировке дыхательного эпителия. Проблемами, стоящими в настоящий момент в данной области являются:

1. установление соответствия между популяциями стволовых и прогениторных клеток дыхательного эпителия, охарактеризованных в различных лабораториях;
2. расширение спектра фенотипических маркеров клеток органов дыхательных путей, в том числе поверхностных антигенов;
3. поиск предшественников клеточных популяций промежуточных (интерстициальных), мышечных и эндотелиальных клеток легкого и дыхательных путей;
4. молекулярная характеристика механизмов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток дыхательного эпителия.

### **3. Методы использования экзогенных стволовых клеток для регенерации органов дыхательной системы**

#### **3.1. Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК)**

В последние 5 лет появилось несколько работ, в которых установлена способность ЭСК мыши и человека дифференцироваться в культуре в клетки с фенотипическими маркерами прогениторных клеток эпителия дыхательных путей АЕС II: экспрессией белков суфрактантов, ламеллярных телец, и



псевдогландулярных структур (Samadikuchaksaraei et al., 2006a,b, Rippon et al., 2006, Denham et al., 2006).

Согласно протоколам, разработанным в лаборатории д-ра Бишоп (Rippon et al., 2006), эмбрионидные тельца мышцы культивируют в течение 10 дней в суспензии, во время культивирования применяется кратковременная обработка высокими концентрациями активина А, что увеличивает эффективность дифференцировки клеток в дефинитивную эндодерму. Также такой дифференцировке способствовала замена в среде бычьей сыворотки FBS на KOSR (KnockOut Serum Replacement, Invitrogen) – заменитель сыворотки, специально разработанный для культур эмбриональных стволовых клеток. Затем культуру переводили в прикрепленное состояние на желатинизированную поверхность на 10 дней, после чего добавляли специализированную среду SAGM (small airway growth medium), содержащую специфические ростовые факторы. Используемая линия ЭСК мышцы была модифицирована таким образом, что под контролем SPC-промотора (гена, кодирующего суффрактант С, экспрессия которого специфична для АЕС II клеток) находилась кодирующая последовательность флуоресцентного белка EGFP, что позволяло оценивать стадию дифференцировки. Методами иммунофлуоресценции, а также методом real time PCR было показано, что эпителиальные клетки, которые получают при применении данного протокола, имеют профиль экспрессии генов сходный с клетками-предшественниками легких в составе эндодермы передней кишки и ранних легочных пузырьков до дифференцировки альвеолярного эпителия. Ранее этими же авторами был описан протокол с использованием на первых двух стадиях культивирования бычьей сыворотки, согласно которому получались более дифференцированные клетки, но в крайне малом количестве (2,5%) (Samadikuchaksaraei and Bishop, 2006). С точки зрения возможного применения в регенеративной медицине получение прогениторных клеток является более предпочтительным, чем получение терминально дифференцированных клеток.

Также этот коллектив исследователей показал применимость разработанных протоколов для дифференцировки ЭСК человека. О получении АЕС II судили по присутствию суффрактанта С и его матричной РНК методами иммуно-окрашивания

и RT-PCR, а также наличие АЕС II –специфичной ультраструктуре клеток при анализе методами электронной микроскопии (Samadikuchaksaraei et al., 2006).

Для повышения эффективности дифференцировки в клетки АЕС II был предложен метод генетической селекции клеток, экспрессирующих белки-суфрактанты (Wang et al., 2007). В исходную линию ЭСК был встроен ген, придающий устойчивость к неомицину под контролем промотора гена суфрактанта С (SPC). При добавлении селектирующего антибиотика доля популяции АЕС II клеток составила более 99%, однако общее число таких клеток было невелико. В этой же работе была впервые продемонстрирована способность ЭСК дифференцироваться в эпителиальные альвеолярные клетки напрямую, минуя образование эмбрионидных тел.

Альтернативный метод направленной дифференцировки мышечных ЭСК в альвеолярные эпителиальные клетки заключается в кокультивировании ЭСК со смесью клеток фетального легкого (Denham et al., 2006). Хотя такой подход нельзя признать перспективным для возможного последующего клинического применения. Легочные клетки по всей видимости выделяют «обучающие» факторы, способствующие направленной дифференцировке ЭСК, поэтому культуральная среда после культивирования клеток ткани легкого может иметь перспективы применения (см. ниже).

Важнейшим направлением исследований является увеличение эффективности *in vitro* дифференцировки ЭСК в клетки с фенотическими признаками АЕС II. В работе Росцел с соавторами (Roszell et al., 2009) проводили ступенчатую дифференцировку из диссоциированных рассеянных клеток, а не из эмбрионидных тел. Далее авторы исходили из предположения о наличии необходимых ростовых и дифференцировочных факторов в ткани легкого и исследовали среду после культивирования АЕС II-подобной клеточной линии A549. В составе среды был определен секретлируемый фактор Wnt3a, который в сочетании с активинном значительно увеличивал эффективность дифференцировки ЭСК в эндодерму. Конечная стадия дифференцировки в АЕС II-подобные клетки достигалась применением FGF2 (fibroblast growth factor 2).

На увеличение эффективности дифференцировки влияет культивирование клеток на границе раздела фаз воздух-жидкость с использованием поровых мембран Millipore Corporation, Billerica, MA, USA (Coraux et al., 2005, Van Haute et al., 2009). Дифференцировка индуцировалась применением среды hESC без b-FGF и меркаптоэтанола, переход на культивирование на разделе фаз проводили на пятый день дифференцировки.

Данные об *in vivo* применении ЭСК в регенерации легких крайне ограничены. Описано внесение клеток-производных мышечных ЭСК с признаками АЕС II внутрь трахеи фетальной мыши. Клетки сохраняли фенотип в течение 24 часов, но были ли они приживлены и выполняли ли какую-либо функциональную нагрузку, показано не было (Roszell et al., 2009). В недавней работе использовали одну из одобренных линий ЭСК, разработанную в университете Висконсина (линия H9.2) (Wang et al., 2010). В данную линию была проведена трансдукция кассеты с геном неомицина под SPC-промотором, позволяющей отбор АЕС II-подобных клеток. При внесении селективно отобранных дифференцированных клеток (hES-AЕСII) в легкие после повреждения блеомицином у иммуносупрессированных мышей можно было детектировать эти клетки спустя 9 дней, что говорит об их приживлении. Более 20% общего количества клеток, синтезирующих SPC, вели происхождение из hES-AЕСII. Небольшая доля hES-AЕСII дифференцировалась в АЕС I *in vivo*. Имплантации и размножения клеток hES-AЕСII не наблюдалось при их внесении мышам без индукции повреждений. Внесение hES-AЕСII мышам с повреждениями блеомицином существенно уменьшало степень повреждения легких у мышей по сравнению с внесением моноцитов. Хотя нельзя сделать вывод, что являлось причиной терапевтического эффекта: имплантация hES-AЕСII в ткань легкого или их паракринное действие. В связи с ослаблением ограничений на исследования с ЭСК человека в США следует ожидать активного развития области применения ЭСК в лечении повреждений легких.

### 3.2. Использование стволовых клеток взрослого организма

Ранее сообщалось, что стволовые клетки костно-мозгового происхождения, включая гематопоетические стволовые клетки (HSC), мезенхимальные стволовые клетки (MSC), эпителиальные прогениторные клетки (EPC), циркулирующие фибробласты и другие популяции могут встраиваться в дыхательные пути, альвеолярный эпителий, сосудистый эндотелий, интерстициальные структуры легкого. Немалое количество статей посвящено гистологическому доказательству встраивания донорных клеток в легкое реципиента. Судьба донорских клеток определялась при помощи GFP-репортерного гена или при помощи слежения за Y-хромосомой при помощи флуоресцентной *in situ* гибридизации при трансплантации клеток от самца к самке (обзор работ в Weiss et al., 2008). Как правило, успешное приживание донорских клеток определялось предварительными повреждениями легкого (Beckett et al., 2005, Theise et al., 2002, Herzog et al., 2006).

Однако эффективность и физиологическое значение приживания экзогенных стволовых клеток взрослого организма в эпителий дыхательных путей и альвеол в экспериментальных моделях серьезно оспариваются (Kotton et al., 2005, Chang et al., 2005). Во-первых, большинство ранних работ не исключало возможности того, что наблюдаемые клетки донора являются лейкоцитами, а не эпителиальными клетками (не было проведено гибридизации с CD45 и другими маркерами лейкоцитов). Во-вторых, подвергаются сомнениям эксперименты с прослеживанием флуоресцентного сигнала GFP, т. к. в легких присутствуют макрофаги, обладающие автофлуоресценцией (Swenson et al., 2007). В-третьих, в легких, также как в печени и в скелетных мышцах, наблюдается слияние клеток донора с эндогенными клетками вместо истинной дифференцировки клеток донора в эпителиальные клетки (Spees et al., 2003, Harris et al., 2004, Herzog et al., 2007). Например, результаты химеризма в экспериментах по трансплантации между полами могут быть неправильно оценены вследствие утраты Y-хромосомы в гетерокарионах, образовавшихся в результате слияния клеток донора и реципиента (Herzog et al., 2007). Данные о трансплантации взрослых стволовых клеток человека в поврежденные легкие имеют те же недостатки (Suratt et al., 2003,

Mattsson et al., 2004, Kleeberger et al., 2003, Spencer et al., 2005, Bittmann et al., 2001, Davies et al., 2002, Zander et al., 2005, Albera et al., 2005).

Тем не менее, с использованием более строгих методов идентификации клеток (расширенный набор поверхностных рецепторов, методы прослеживания отдельных клонов клеток) удалось продемонстрировать встраивание, хотя и достаточно редкое, стволовых клеток костного мозга или пуповинной крови донора в легочный эпителий, сосудистый эндотелий, интерстициальную ткань легкого реципиента после повреждения органа (Sueblinvong et al., 2008, Macpherson et al., 2005, 2006, Yan et al., 2007, Serikov et al., 2007, Wong et al., 2007, Bruscia et al., 2006, Spees et al., 2007). Несмотря на низкую эффективность приживления, данные о встраивании стволовых клеток костного мозга в эндотелий сосудов и стимуляцию неоангиогенеза послужили причиной для инициации нескольких клинических исследований (Zhao et al., 2005, Raoul et al., 2007, Zhu et al., 2008) для лечения избыточного кровяного давления в легких.

Поиски возможностей и методов использования стволовых клеток взрослого организма для регенерации легких и дыхательных путей должны быть продолжены. Возможно, будут найдены другие популяции клеток, которые могут быть привлечены для регенерации легких в ответ на повреждения, например описанная популяция очень маленьких стволовых плюрипотентных (эмбрионально-подобных) клеток, выделяемая из костного мозга и пуповины (Kucia et al., 2008, 2007). В опытах по реэпителизации трахеи на ксенографтах был установлен вклад циркулирующей клеточной популяции костно-мозгового происхождения с фенотипом поверхностных маркеров CD45+/CXCR+/cytokeratin+ (Gomperts et al., 2006).

Существуют другие потенциальные источники взрослых стволовых клеток, которые мало охарактеризованы в отношении регенерации легкого: клетки пуповинной крови и жировой ткани (Berger et al., 2006, Miao et al., 2006, Traktuev et al., 2008). Кроме того, методами проточной цитометрии среди клеток костного мозга была выделена субпопуляция, экспрессирующая маркер Клара клеток CCSP (Wong et al., 2009). При *ex vivo* культивировании на разделе фаз эти клетки начинали экспрессировать маркеры, специфичные для АЕС I, АЕС II и базальных

клеток. При внесении в трахею или в вену они участвовали в репарации поврежденного легкого *in vivo*.

Большинство исследований применяло системную трансплантацию клеток в кровотоки, возможно, что региональное применение непосредственно внутрь трахеи может повысить эффективность регенерации, однако, подтверждающих экспериментальных данных пока недостаточно (Wong et al., 2009).

Важным направлением является изучение механизмов, с помощью которых экзогенные стволовые клетки привлекаются в ткань поврежденных легких и дыхательных путей. Действительно, после повреждения увеличивается количество клеток костного мозга, оседающих в легких (Spees et al., 2003, Harris et al., 2004, Herzog et al., 2007), но растворимые медиаторы и поверхностные рецепторы, отвечающие за этот процесс, практически не охарактеризованы.

Кроме того, должны быть изучены временные рамки применения экзогенных стволовых клеток при регенерации органов дыхательной системы. Так, системное применение мезенхимальных стволовых клеток через 4 часа после облучения легкого приводило к преимущественному встраиванию эпителиальных и эндотелиальных донорских клеток, а применение мезенхимальных клеток в более позднем периоде - интерстициальных клеток, что способствовало развитию фиброза (Epperly et al., 2003, Yan et al., 2007).

Таким образом, к настоящему моменту разработано несколько протоколов дифференцировки ЭСК мыши и человека в культуре в клетки дыхательного эпителия, но вследствие недостаточности данных об их *in vivo* применении еще рано говорить о возможности их клинического использования. Применение экзогенных стволовых клеток взрослого организма ограничено низкой эффективностью приживления клеток донора, кроме того, практически не охарактеризовано паракринное действие таких клеток. Разработка методов использования стволовых клеток взрослого организма должна быть продолжена и направлена в первую очередь на поиск новых источников стволовых клеток для клеточной трансплантации и оптимизацию протоколов трансплантации.

#### **4. Методы анализа экспрессии генов стволовых клеток и клеток в процессе дифференцировки**

Применение стволовых клеток, как эмбриональных, так и тканевых, ограничивается отсутствием надежных методов характеристики и выделения отдельных клеточных популяций, методов определения гетерогенности клеток внутри и между субпопуляциями, а также методов, позволяющих тонкое различение между собственно стволовыми клетками и их начавшими дифференцировку потомками.

На практике стволовые клетки представляют собой крайне гетерогенные популяции клеток. Например, на глобальном уровне индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) практически не отличаются от ЭСК. Они обладают свойствами плюрипотентности, неограниченной пролиферации, образуют тератомы *in vivo* (Muller et al., 2008). Однако при переходе на более детальные уровни анализа, такие как общегеномные исследования, выявляются значительные различия (Hu et al., 2010, Kim et al., 2010, Hussein et al., 2011, Laurent et al., 2011, Lister et al., 2011). В процессе репрограммирования ИПСК могут накапливать точечные мутации (Gore et al., 2011), изменять число копий генов (Hussein et al., 2011, Laurent et al., 2011). Линии ИПСК имеют различия в индивидуальных профилях метилирования генома, зависящие от родительской соматической линии клеток (Kim et al., 2010, Ohi et al., 2011). ЭСК человека также далеко не идентичны. Существенные вариации были описаны в способности к дифференцировке между различными ЭСК человека (Osafune et al., 2008).

Как уже отмечалось, основной проблемой биологии тканевых стволовых клеток (за исключение кроветворных стволовых клеток) является неоднозначность их идентификации. Так, в случае эпителия дыхательных путей возможно, что описанные прогениторные клетки (токсин-устойчивые Клара клетки, VACS и др.) представляют собой различные интерпретации одной и той же клеточной популяции (Snyder et al., 2009).

При направленной дифференцировке стволовых клеток в ту или иную клеточную линию, как правило, говорят о получении «подобных» клеток

(гепатоцит-подобных, АЕС II – подобных и т. д.). Это объясняется тем, что при появлении в клетках, индуцированных к дифференцировке, определенного специфического маркера, экспрессия других признаков может существенно отличаться от нативных клеток, а также варьировать в зависимости от протокола дифференцировки.

Для характеристики клеточных линий и стадий их дифференцировки применяют отдельные маркеры и их сочетания, а также методы масштабного профилирования, которые и будут рассмотрены ниже.

#### **4.1. Отдельные маркеры и их сочетания для характеристики стволовых клеток и стадии дифференцировки**

Определение экспрессии выборочных генов-маркеров традиционно проводится методами иммуногистохимии, а также посредством обратной транскрипции в сочетании с количественной ПЦР.

Для примера рассмотрим экспрессию гена POU5F1/OCT4 в эмбриональных стволовых клетках. Этот ген экспрессируется в мышинных ооцитах, ранних эмбрионах и клетках зародышевого пути (Scho et al., 1989a, b), являясь одним из их характерных маркеров. Индукция экспрессии только одного этого гена способна вызывать репрограммирование соматических клеток в плюрипотентные клетки (Kim et al., 2009). Тем не менее, экспрессия POU5F1/OCT не является обязательным условием для всех стволовых клеток организма (Lengner et al., 2007). Кроме того, некоторые нестволовые клетки в тканях, прилегающих к плюрипотентным тканям, также экспрессируют этот маркер (Scho et al., 1990). Следовательно, строго необходимо рассматривать наборы нескольких маркеров для определения типа клеток (Ponten et al., 2009, Ravasi et al., 2010).

При создании панели маркеров для характеристики клеток следует учитывать вариабельность свойств независимо выделенных линий. Например, ген POU5F1/OCT4 экспрессируется на высоком уровне во всех линиях ЭСК, но другие транскрипционные факторы STELLA1, REX1, NANOG допускают вариации в эффективности экспрессии в линиях ЭСК. Транскрипционные факторы STELLA1



и NANOG экспрессируются в 20-30 и 80% линий ЭСК, соответственно (Graf et al., 2008). Клетки линий, экспрессирующих STELLA1 и NANOG, более схожи с клетками внутренней клеточной массы. Клетки линий, экспрессирующих NANOG, GATA6, HEX1, более предрасположены к дифференцировке в первичную эндодерму (Canham et al., 2010, Hayashi et al., 2008), а клетки линий, которые не экспрессируют REX1 (FGF5), - в первичную эктодерму. Приведенные данные о вариабельности клеточных линий свидетельствуют об исходном предифференцированном состоянии той или иной линии ЭСК (Rathjen et al., 1999) и создают сложности в определении характерной панели маркеров для идентификации.

Для поиска новых уникальных маркеров (дифференциально экспрессирующихся генов) в стволовых, прогениторных и зрелых клетках анализируют профили экспрессии, полученные методами транскрипционного профилирования на микроматрицах, а также в последнее время получил развитие метод профилирования транскриптов с помощью широкомасштабного секвенирования. Например, для прогениторных клеток бронхиолярного эпителия (Клара клеток) при анализе результатов транскрипционного профилирования у мышей на микроматрицах были определены новые маркеры: Fmo3 (flavin monooxygenase 3), Aox3 (aldehyde oxidase 3), Cldn 10 (claudin 10) (Zemker et al., 2008). Новые и существующие маркеры также удалось разбить на группы в зависимости от стадии созревания клеток. Cldn 10 равномерно экспрессируется во всех эпителиальных клетках на эмбриональной стадии E14.5, но при появлении CCSP на стадии E18.5 экспрессия Cldn 10 остается только в секреторных клетках. Созревание секреторных клеток ассоциировано с постепенным усилением экспрессии Pon1, Aox3, Sur2f2 на поздних эмбриональных и постнатальных стадиях.

При изучении базальных клеток бронхиального эпителия взрослого человека методами транскрипционного профилирования на микроматрицах удалось установить 1161 гена, экспрессия которых более чем в 5 раз больше по сравнению с дифференцированным эпителием (Hackett et al., 2011).

Для поиска специфических молекулярных маркеров клеточных популяций и стадий дифференцировки могут быть использованы профили некодирующих малых РНК. Было показано, что для бронхио-альвеолярных стволовых клеток характерны маркеры miR-142-3p, miR-451, miR-106a, miR-142-5p, miR-15b, miR-20a, miR-106b, miR-25, miR-486 (Qian et al., 2008).

Несмотря на широкую применимость, методы транскрипционного профилирования имеют существенные ограничения (Schwanhausser et al., 2011). Имеются несоответствия между данными о профилях транскрипции, эпигенетическом состоянии и уровне белков в клетке в процессе дифференцировки стволовых клеток (Lu et al., 2009). Более надежными принято считать данные протеомного анализа, непосредственно отражающие присутствие тех или иных белков в клетке. В то же время данные о профиле экспрессии стволовых клеток и его динамике в процессе дифференцировки, полученные протеомными методами, главным образом, масс-спектрометрией, очень ограничены. Ранние работы в этом направлении использовали главным образом полуколичественные методы. В работе Ван Нуф с соавторами (Van Hoof et al., 2006) сравнивались протеомы недифференцированных ЭСК человека с гетерогенной популяцией, полученной при спонтанной дифференцировке на 12 день. Около 700 белков из более чем 2300 оказались специфичными исключительно для недифференцированных клеток. Среди них 191 белок также был характерен для недифференцированных ЭСК мыши. Новыми ранее невыявленными маркерами оказались TOP2A, MCM4, KPNA2, Sall4. Хотя методами масс-спектрометрии может быть выявлена лишь наиболее представленная фракция протеома, этот метод оказался пригоден для выявления транскрипционных факторов, присутствующих в незначительных концентрациях, например, OCT4 и UTF1 (Van Hoof et al., 2008).

Большим преимуществом методов масс-спектрометрии является возможность получения данных о протеоме специфических клеточных компартментов. Методом центрифугирования ядер ЭСК и их нейтральных производных с последующим двумерным электрофорезом и масс-спектрометрией дифференциально экспрессированных белков удалось выявить дополнительный потенциальный маркер ЭСК человека CPSF6 (Barthelery et al., 2009).

## **4.2. Использование профилей экспрессии для характеристики стволовых клеток и стадии дифференцировки**

Одновременное развитие широкомасштабных методов анализа и биоинформатических подходов к интерпретации результатов позволяет отказаться от выделения отдельных маркеров или их панелей, а использовать непосредственно всю совокупность экспрессирующихся генов для характеристики типа клетки. Возможно, с помощью этого подхода удастся установить соответствие между линиями ЭСК, полученных в лабораториях по всему миру, которых уже в 2010 году насчитывалось более 1000 (Loser et al., 2010), и большая часть которых слабо охарактеризована, а также проследивать стадии их дифференцировки.

Традиционно общий паттерн экспрессии генов устанавливают методами транскрипционного профилирования, данные транскрипционных профилей размещают в базы данных, наиболее используемые из которых NCBI GEO (National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) и ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). К сожалению, остро стоит проблема непредсказуемого качества размещенных данных. По некоторым оценкам, около 10% всех данных, размещенных в ArrayExpress непригодны для анализа вследствие технических трудностей (McCall et al., 2011). По другим данным, до 40% данных не проходит критерии отбора материала для мета-анализа профилей экспрессии (Lukk et al., 2010). Другой проблемой, препятствующей мета-анализу, является разобшенная структура данных (проблема “batch” эффекта). Новые методы определения профилей транскрипции, основанные на технологиях секвенирования нового поколения, также имеют указанные недостатки (Leek et al., 2010). Вследствие быстрого эволюционирования методик секвенирования проблема “batch” эффекта стоит еще острее. Было высказано предложение о том, чтобы все, даже небольшие, эксперименты планировались таким образом, чтобы была возможность инкорпорировать их результаты в общий массив данных. Важное значение для интеграции имеют количество повторов и контрольный образец.

С увеличением количества данных увеличивается «биологический шум», учитьвание которого позволяет вычленять реально значимую информацию. Например, Guenther с соавторами (Guenther et al., 2010), основываясь на значительном количестве повторных экспериментов по секвенированию иммунопреципитированных фрагментов хроматина (CHIP-seq) и транскрипционному профилированию геной экспрессии, пришли к выводу об отсутствии воспроизводимых признаков ИПСК. В то время как другие авторы ошибочно сообщали о наличии таких признаков, основываясь только на трех повторах транскрипционного профилирования (Affimetrix GeneChip) (Chin et al., 2009).

Интегральные подходы привели к созданию коллекций данных для стволовых клеток Cell Matrix 1 (Muller et al., 2008) и Cell Matrix 2 (Laurent et al., 2011, Muller et al., 2011). Отчасти в этих коллекциях “batch effect” можно проконтролировать путем сравнения данных, полученных для одного биологического образца в разных экспериментальных условиях, а также данных, полученных для разных биологических образцов в одних экспериментальных условиях (Cheng et al., 2009). Например, Vock с соавторами построили предсказательную модель направлений дифференцировки, основываясь на 20 линиях ЭСК человека и 12 ИПСК человека, культивированных в идентичных условиях (Boulting et al., 2011, Vock et al., 2011). Хотя остается установить, насколько применимы эти локально выработанные модели к использующимся в настоящее время технологиям культивирования стволовых клеток человека.

Другие авторы в результате биоинформатического анализа и кластеризации масштабных данных о профилях экспрессии эмбриональных, мезенхимальных, нейрональных и других линий стволовых клеток доложили о создании программного продукта Plurinet, который позволяет относить вновь выделенные клеточные линии к той или иной категории (Muller et al., 2008).

Таким образом, для характеристики популяций клеток, линий стволовых клеток и стадий их дифференцировки помимо традиционного иммуноферментного анализа поверхностных антигенов в настоящее время используют

транскрипционное профилирование методами гибридизации на микроматрицах и широкомасштабного секвенирования и протеомный анализ методами масс-спектрометрии. Тенденцией развития является переход от использования одного или нескольких маркеров к характеристике общего профиля экспрессии, характерного для данного типа клеток. Однако, технологии профилирования, активно развивающиеся в последнее время, нуждаются в аккуратной интерпретации и требуют выработки специальных биоинформатических инструментов обработки данных.

## **5. Использование каркасов и биореакторов при выращивании легких и дыхательных путей**

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 биodeградируемые полимеры, такие как полигликолиды, полилактиды, их сополимеры и др. (Mikos et al 1994, Choi et al 2008, Lee et al 2008).

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 внутрилюминальные и экстралюминальные компартменты (Macchiarini et al., 2008, Asnaghi et al., 2009).

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 естественный 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 внеклеточный матрикс обеспечивает в два раза более высокую скорость пролиферации, чем коллагеновые матриксы в применяемых ими условиях в биореакторе.

Контролируемые условия культивирования в биореакторе позволяют добавлять биологически-активные компоненты, увеличивающие жизнеспособность клеток. При использовании недифференцированных стволовых клеток возможно добавление в культуральную среду факторов роста и дифференцировки.

Ниже приведены примеры использования каркасов и биореакторов в биоинженерии легких и дыхательных путей.

*Создание трахейных хрящей в эксперименте* (Omori et al., 2008). Каркас представлял собой трубку из марлекса (торговое название для полипропилена и полиэтилена высокой плотности), усиленную нитями полипропилена и покрытую коллагеном. Клеточное покрытие *ex vivo* не создавалось, в эксперименте при имплантации животным (собакам) наблюдали формирование на люминальной поверхности реснитчатого эпителия.

*Формирование элементов паренхимы легочной ткани с использованием фетальных клеток.* Андраде с коллегами использовали губки Gelfoam в качестве каркаса для засеивания фетальными клетками легкого крысы. Размеры пор материала примерно соответствуют размерам альвеол, поэтому в результате эпителизации поверхности матрикса следует ожидать образования альвеолоподобных структур. Действительно, при имплантации кусочков губки, заселенных клетками в паренхимальную область легких крысы, внесенные клетки прослеживались в течение 35 дней (по сохранению красителя CMTR [5-(and-6)-{[(4-chloromethyl)benzoyl]amino}tetramethylrhodamine]), наблюдалось образование структур, сходных по размеру с альвеолами на границе между губкой и окружающими тканями легкого. Важно отметить, что у реципиента не возникало существенной иммунной реакции. Также наблюдалась реваскуляризация и постепенное исчезновение материала губки через несколько месяцев (Tormeï et al., 2009, Andrade et al., 2007).

В другой работе смесь фетальных клеток мыши наносилась на Матригель и трансплантировалась подкожно в переднюю абдоминальную стенку мыши линии C57/BL6 (Mondrinos et al., 2008). Усиление васкуляризации достигалось включениями в состав Матригеля поливинила с нанесенным фактором роста фибробластов 2 (FGF2). Через одну неделю детектировали образование клеток, экспрессирующих маркер эпителиальных клеток дыхательного эпителия pro-SPC, а также прорастание сосудистых структур.

*Биоинженерное легкое.* Результаты работ по созданию биоинженерного легкого были опубликованы примерно в одно время двумя группами исследователей. В одном случае использовался децеллюризованный тканевой матрикс легкого крысы (Petersen et al., 2010, Calle et al., 2011). Децеллюризация

проводилась в растворе 8mM CHAPS, 1M NaCl, 25mM EDTA in 1X PBS с последующей тщательной отмывкой. Матрикс сохранял структуры бронхиального дерева и сосудистой системы, а также базальную мембрану, включающую коллаген IV, ламинин и фибронектин. Матрикс помещался в биореактор, который воспроизводил основные физиологические черты легкого: вентиляцию с отрицательным давлением и пульсирующую перфузию в сосудах. В биореактор вносились клетки сосудистого эндотелия и дыхательного эпителия, взятые от новорожденной крысы-донора (Cortiella et al., 2010). Сами авторы отмечают, что наиболее критическими составляющими протокола являются поддержание стерильности и физические параметры вентиляции легкого и перфузии сосудов. При имплантации выращенного легкого в крысу, оно было способно участвовать в газообмене с короткими промежутками времени (45-120 минут).

Другой группой исследователей также использовался тканевой каркас крысы, но децеллюризация проводилась 0,1% SDS (Ott et al., 2010, Song et al., 2011). Репопуляция осуществлялась эндотелиальными клетками пуповины человека и альвеолярными эпителиальными клетками (линия A549), а также в другом эксперименте смесью фетальных клеток легкого крысы (FLC). Легкие, выращенные на каркасе, были способны к газообмену в условиях эксперимента *in vitro* и при ортотопической трансплантации.

По-видимому, для создания сложных трехмерных структур, таких как паренхима легкого с пронизывающей ее сосудистой системой, создание каркасов из искусственных материалов пока невозможно, и использование децеллюризованных тканевых каркасов остается единственной альтернативой.

Приведенные исследования демонстрируют потенциальную возможность регенерации легочной ткани *in vivo* с использованием фетальных клеток, но для клинического применения необходимо найти другие, этически допустимые, источники клеток. Поэтому важную роль уделяют разработке методов применения стволовых клеток, хотя работ в этом направлении пока мало.

*Формирование элементов паренхимы легочной ткани с использованием стволовых клеток.* Популяция клеток овцы, охарактеризованная как соматические прогениторные клетки легкого взрослого организма, культивировалась на



конструкциях из искусственных полимеров полигликолевой кислоты (PGA) или Pluronic F-127 (PF-127) (Cortiella et al., 2006). Заселенные каркасы были пересажены подкожно голым мышам или в рану при резекции легкого у овцы, в результате формировались структуры, подобные легочной паренхиме и воздушным путям, также наблюдалось образование гладких мышц. Хотя PGA является прекрасным субстратом для культивирования клеток *in vitro*, *in vivo* культивирование вызывало существенный иммунный ответ, препятствующий образованию целостной ткани. Использование PF-127 вызывало значительно меньший иммунный ответ и выглядело более предпочтительным.

Существуют также данные об использовании MSC жировой ткани в регенерации легочной паренхимы. MSC культивировались *ex vivo* на матрасах из PGA и затем наносились в рану при частичной резекции легкого у крыс, был продемонстрирован эффект усиления альвеолярной и васкулярной регенерации (Shigemura et al., 2006). Хотя эти авторы также используют полигликолевую кислоту, они не сообщают об осложнениях, связанных с иммунным отторжением.

*Биоинженерия дыхательных путей.* В 2008 году профессору Паоло Маккиарини с коллегами удалось получить искусственную трахею из аутологичных клеток пациента на децеллюризованном внеклеточном матриксе, взятом от донора (Macchiarini et al., 2008). Использовались аутологичные MSC из костного мозга, которые культивировались и дифференцировались в хондробласты, после этого засеивались в децеллюризованный аллогraft бронха вместе с эпителиальными клетками пациента. Полученный орган был использован для замены левого главного бронха. Осложнений в постоперационный период не возникло, и через 3 месяца у пациента восстановилась нормальная легочная функция. В 2011 году этой же группе удалось получить и имплантировать орган из аутологичных MSC на нанокompозитном биodeградируемом каркасе из POSS-PCU (polyhedraloligomeric silsesquioxane-poly(carbonate-urea)urethane) (Jungebluth et al., 2011). Данный материал обладает несомненными преимуществами, т. к. 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). Использование искусственных полимеров имеет много преимуществ (см. Табл.).

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).

Таким образом, одновременное развитие методов клеточного культивирования и дифференцировки, методов и материалов, необходимых для создания внеклеточных матриксов и каркасов, и совершенствование биореакторов привели к значительному прорыву в тканевой инженерии легких и дыхательных путей. К настоящему времени искусственно выращены трахейные хрящи, элементы легочной паренхимы, биоинженерное легкое, биоинженерная трахея.

Табл. Сравнение каркасов для биоинженерии дыхательных путей, 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 размерами, идеально соответствующие органу реципиента
Возможность бактериального заражения	Высокая, существует во время забора донорского материала и in vitro манипуляций	Производство может быть 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	Мало предсказуемы вследствие 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