

DOI: 10.15825/1995-1191-2014-3-93-108

ТЕХНОЛОГИИ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Севастьянов В.И.

Отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

В статье представлены основные результаты фундаментальных и прикладных исследований, проводимых сотрудниками отдела биоинженерных технологий и тканевой инженерии ФГБУ ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова в 2010–2014 годы.

Ключевые слова: биоматериалы, биополимерные имплантаты, биоинженерия, регенеративная медицина, тканеинженерные конструкции, клеточно-инженерные конструкции.

TECHNOLOGIES OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE

Sevastianov V.I.

Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

The paper presents the main fundamental and applied results obtained by the Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering over the period of 2010–2014.

Key words: biomaterials, biopolymer implants, bioengineering, regenerative medicine, tissue-engineered construct, cell-engineered construct.

ВВЕДЕНИЕ

Регенеративная (восстановительная) медицина – это обобщенный термин для обозначения различных терапевтических и хирургических клеточных технологий (organ regeneration and tissue engineering), направленных на частичную или полную компенсацию функций поврежденных или утраченных органов (тканей) [1–3]. В регенеративной медицине выделяют два основных направления.

Одно из них – регенеративная клеточная (или просто клеточная) терапия связана со стимулированием клеточной / тканевой регенерации (cell-based tissue regeneration) с помощью трансплантации стволовых клеток или их ассоциатов с соматическими клетками [4–6].

Второе направление, которое и является предметом настоящей статьи, заключается в восстановлении целостности и функций тканей и органов с помощью так называемых биоискусственных (тканеинженерных) конструкций (ТИК) (biomaterial-based tissue regeneration), включающих в себя следующие компоненты [7]:

1) клетки, способные формировать функционирующий внеклеточный матрикс;

- 2) подходящий биodeградируемый носитель (матрикс) для трансплантации клеток;
- 3) биоактивные молекулы (цитокины, факторы роста), которые оказывают биостимулирующее действие на клетки поврежденной ткани.

В качестве клеточной компоненты [2–7] используют клетки различных типов и разного происхождения, включая эмбриональные прогениторные клетки (клетки-предшественники), мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) и дифференцированные (специализированные, тканеспецифические) клетки. Аутологичные или аллогенные дифференцированные клетки получают с помощью биопсии, культивируют *in vitro* и трансплантируют в место повреждения.

Технологии тканевой и регенеративной медицины можно разделить на три группы:

- биостимуляция регенерации тканей пациента с помощью биоактивных материалов;
- клеточная терапия – использование стволовых клеток или сигнальных биомолекул для стимуляции процессов регенерации тканей;
- тканевая инженерия – тканеинженерные конструкции органов и тканей.

В свою очередь, тканеинженерные конструкции (ТИК) делятся на два принципиально разных вида медицинских продуктов:

- имплантаты из «нежизнеспособных» биологических тканей, к которым, например, относятся биоклапаны сердца, биопротезы кровеносных сосудов – *медицинские изделия*;
- системы, состоящие из биостабильного или биодеградируемого матрикса, жизнедеятельных стволовых или тканеспецифических аутологичных или аллогенных клеток и (или) биоактивных молекул (цитокины, факторы роста и др.) – *клеточные продукты*.

Немного о разнице между тканевой инженерией и регенеративной медициной, которые часто употребляют как синонимы. Тканевая инженерия включает в себя тканеинженерные конструкции, либо совсем не содержащие клеток, либо содержащие тканеспецифические (т. е. дифференцированные) клетки. Данное направление работ относится к технологиям заместительной медицины. Регенеративная медицина имеет дело с тканеинженерными конструкциями, содержащими стволовые клетки и (или) биомолекулы. К ним же относятся ТИК, в которых клеточная компонента состоит из тканеспецифических и стволовых клеток. Соответствующие биомедицинские клеточные технологии относятся к технологиям регенеративной медицины.

Анализ полученных в ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова результатов по разработке ТИК как клеточных продуктов, а именно, тканеинженерных конструкций хрящевой ткани, печени и поджелудочной железы, и является основным содержанием данной статьи.

РАЗРАБОТКА ТРЕХМЕРНЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Наибольший интерес для тканеинженерных конструкций представляют трехмерные матриксы из биодеградируемых биологических или синтетических полимеров, для изготовления которых нами был привлечен целый ряд технологий [7–16]:

- ультрадиспергирование;
- выщелачивание;
- гель-сублимация;

- электроспиннинг;
- биопринтирование;
- сверхкритическая флюидная (СКФ) пластификация полимеров и их вспенивание.

Трехмерные биорезорбируемые пористые матриксы являются каркасными элементами ТИК, обеспечивающими жизнедеятельность клеток в процессе формирования определенных типов живых тканей [8]. Они способствуют локализации клеток в области имплантации, одновременно являясь их носителем, временно выполняющими функции естественного внеклеточного матрикса.

Так, сотрудниками Института прикладных лазерных и информационных технологий РАН (ИПЛИТ РАН) были получены разнообразные биорезорбируемые матриксы на основе алифатических полиэфиров (в том числе и содержащие биоактивные компоненты – гидроксиапатит, энзимы, факторы роста и лекарственные препараты) с объемной пористостью вплоть до 70% [13].

Дальнейшее увеличение пористости (особенно важное для успешного решения задач инженерии биотканей) наталкивалось на определенные трудности. Например, расширение СКФ пластифицированной полимерной массы низкомолекулярных (до 20 кДа) полилактидов при сбросе давления диоксида углерода в свободном объеме приводило к образованию большого количества замкнутых пор с невозпроизводимой от эксперимента к эксперименту внутренней структурой. В то же время подобная СКФ-обработка полилактидов с большей молекулярной массой (и особенно их сополимеров на основе полилактогликолидов, имеющих существенно более высокую вязкость в пластифицированном с помощью ск-СО₂ состоянии) вообще не позволяла получать финальную пористость выше 50–60 об.%.

В связи с этим, были проведены исследования, направленные на расширение максимального диапазона пористости (вплоть до 90 об.%) с одновременным улучшением воспроизводимости параметров структуры и формы биорезорбируемых полимерных систем требуемой архитектоники [17–19]. Для достижения поставленной цели был разработан метод, основанный на пластификации и вспенивании в ск-СО₂ различных алифатических полиэфиров в пресс-форме, находящихся при атмосферном или

Севастьянов Виктор Иванович – д. б. н., профессор, заведующий отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация.

Для корреспонденции: Севастьянов Виктор Иванович. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. 8 (499) 196-88-74. E-mail: viksev@yandex.ru.

Sevastianov Victor Ivanovich – Professor, Head of the Department of Biomedical Technologies and Tissue Engineering, V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

For correspondence: Sevastianov Victor Ivanovich. Address: 1, Schukinskaya Str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. 8 (499) 196-88-74. E-mail: viksev@yandex.ru.

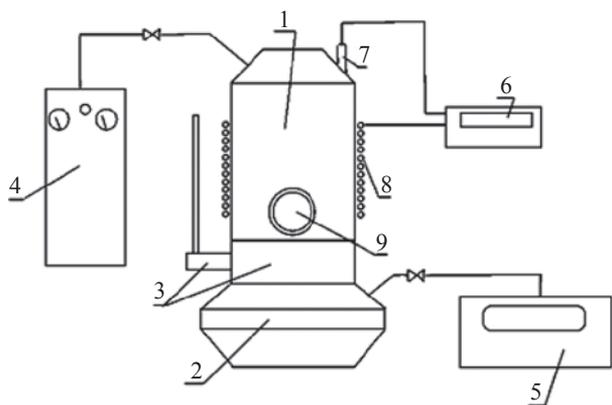


Рис. 1. Принципиальная схема экспериментальной СКФ-установки для получения высокопористых полимерных матриц: 1 – реакционная камера (автоклав); 2 – ресивер; 3 – выпускное устройство с шаровым клапаном; 4 – насос высокого давления CO_2 ; 5 – автоматический регулятор давления; 6 – блок управления нагревателем; 7 – термопара; 8 – резистивный нагреватель; 9 – сапфировое окно для визуальных наблюдений

повышенном (до 6 МПа) давлении диоксида углерода. Эксперименты проводили на ранее разработанной установке для сверхкритической флюидной экструзии, схема и общий вид которой приведена на рис. 1 [13].

В качестве исходных полимеров использовались аморфные D,L-полилактиды марки PURASORB PDL02 и PDL04 (приведенная вязкость 0,2 и 0,4 дл/г соответственно), а также сополимер полилактогликолида PDLG7502 (75% полилактида и 25% полигликолида, приведенная вязкость 0,2 дл/г) производства компании PURAC Biochem bv (Нидерланды). Диоксид углерода (марки ОСЧ, ГОСТ 8050-85) производства Балашихинского кислородного завода (г. Балашиха, Московская обл.) использовался в экспериментах без какой-либо дополнительной очистки.

На рис. 2 представлена типичная микрофотография срезов получаемых образцов.

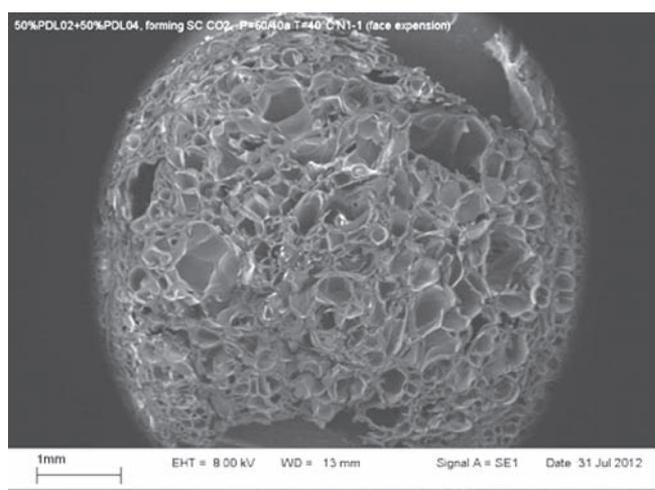


Рис. 2. Полимерный матрикс из смеси PDL02 и PDL04 пористостью ~ 90%

Наличие радиального градиента плотности в образцах связано с особенностью выхода диоксида углерода из цилиндра, ограниченного газонепроницаемыми тефлоновыми стенками. Более пористая центральная область образуется за счет коаксиального потока выходящего газа. Следует отметить, что подобная неравномерность обратно связана с вязкостью смеси. Увеличение вязкости ведет к снижению неравномерности радиального градиента плотности формируемого матрикса.

На рис. 3 приведены микрофотографии полимерных матриц из смеси полимеров PDL02 и PDL04 с пористостью порядка 80% (А) и 60% (Б) соответственно, которая может быть повышена до 90% и более путем изменения скорости выхода газа из пластифицированного объема полимера.

В последние годы в качестве материалов, применяемых в тканевой инженерии и регенеративной медицине для создания биodeградируемых 3D-матриц, все чаще стали использовать биополимеры. Замечу, что работы по созданию биорезорбируемых систем на основе биополимеров, основные представители которых перечислены в таблице, мы начали 15 лет назад [20].

Биополимерные материалы или их композиции, содержащие биологически активные вещества, по сравнению с биodeградируемыми синтетическими полимерами в наибольшей степени удовлетворяют основным требованиям, предъявляемым к матриксам в тканеинженерных конструкциях, таким как:

- биосовместимость изделия и продуктов его деградации;
- наличие биостимулирующих свойств;
- возможность регулировать время биodeградации;

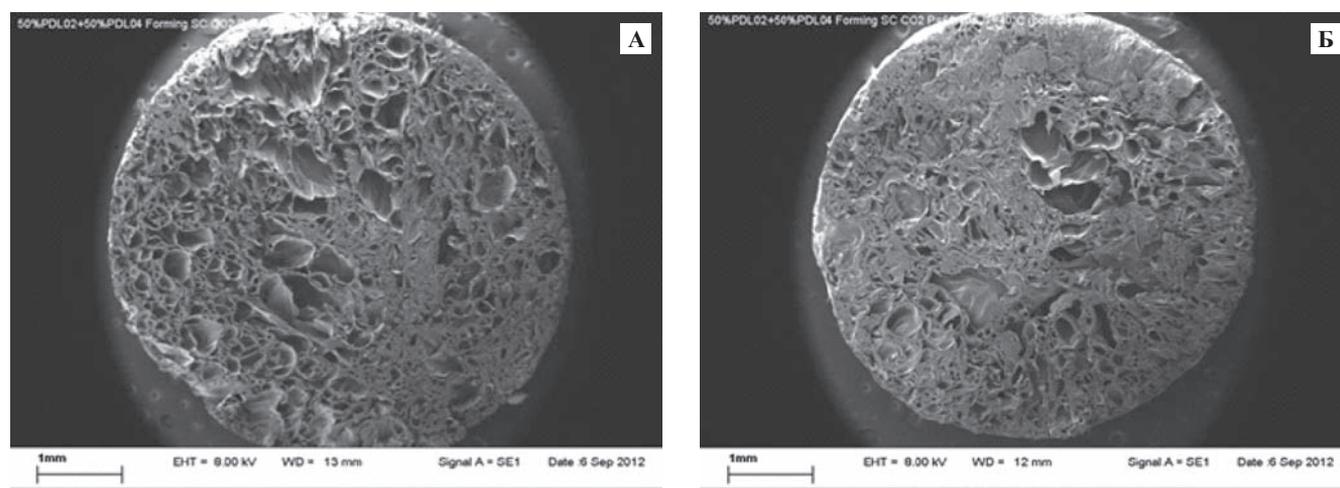


Рис. 3. Пористые полимерные матрицы из смеси полимеров PDL02 и 04 с пористостью 80% (А) и 60% (Б)

**Биополимерные материалы,
наиболее часто используемые в тканевой
и регенеративной медицине**

Таблица

Наименование биополимера	Источник
Альгинаты	Полисахарид из бурых морских водорослей
Коллаген	Белок внеклеточного матрикса
Желатин	Термически денатурированный коллаген
Хитозан	Производное хитина (раки, крабы, креветки)
Фиброин шелка	Белок кокона
Спидроин	Белок паутины
Гиалурионовая кислота	Компонент внеклеточного матрикса

- способность к неоваскуляризации и неиннервации;
- выполнение функции каркаса и питательной среды для клеточных компонентов тканеинженерных конструкций;
- наличие адгезивных свойств к клеточным культурам и стимулирование их пролиферации;
- возможность стерилизации без изменения медико-технических свойств конечного продукта.

Можно выделить две основные области применения биополимерных имплантатов в восстановительной и заместительной медицине:

- как самостоятельная имплантируемая система для замещения дефектов тканей, в том числе для стимулирования процессов регенерации собственных клеток пациента;
- в качестве системы доставки и временного каркаса для трансплантации клеток и создания тканеинженерных конструкций.

Однако при создании матриц из биополимерных материалов необходимо найти пути устранения

таких недостатков, как высокая стоимость получения биополимеров, неудовлетворительная воспроизводимость их свойств, сложность обработки, плохая механическая прочность и для некоторых из них, например в случае коллагена, быстрое время биодеградации [8, 9].

Высокая потенциальная роль биополимеров в биомедицинских технологиях нашла отражение при описании сценария коммерциализации в США технологий регенеративной медицины в области тканевой инженерии и регенерации органов с 2000-го до 2060 г. [2], состоящая из следующих этапов:

- 2000 г. – коммерциализация результатов исследований в области тканевой инженерии;
- 2015 г. – полное замещение синтетических биодеградируемых матриц на матрицы из биологических полимеров;
- 2025 г. – разработка промышленных технологий (масштабирование технологий) для культивирования аутологичных клеток и технологий тканевой инженерии на их основе;
- 2050 г. – разработка технологий конвертации аллогенного генотипа в аутологичный генотип;
- 2060 г. – создание коммерческих банков для создания и хранения биоискусственных органов («запасных частей») для конкретного реципиента.

В 2000-х годах нами были разработаны имплантируемые биоматериалы двух типов: гидрогелевые матрицы на основе компонентов внеклеточного матрикса сельскохозяйственных животных [16] и каркасные матрицы на основе бактериальных сополимеров [20]. Обе линейки матриц разрешены к клиническому применению и нашли свою нишу в технологиях заместительной и регенеративной медицины [21–24]. Тем не менее остается актуальным поиск новых способов создания высокопористых (70–90 об. %) 3D-матриц, а также новых подходов к контролю и управлению их физико-химическими и биологическими свойствами.

Тканеспецифические мелкодисперсные матриксы для ТИК хрящевой ткани

Если достаточную механическую прочность и пористую структуру матриксов для создания биоинженерных конструкций твердых тканей (костной, хрящевой) можно легко обеспечить за счет подбора конструкционного материала и технологии его переработки, то проблему биоимитирования биологических и функциональных свойств каркаса ТИК решить значительно сложнее. Несмотря на то что существующие к настоящему времени матриксы для ТИК хрящевой ткани обладают достаточно высокой биосовместимостью, плотность мест связывания клеток на их поверхности невелика, а микроокружение адгезированных клеток не обеспечивает комфортных условий для их роста, пролиферации и *in vitro* дифференцировки в случае иммобилизованных стволовых клеток.

Одним из важных свойств, которыми должен обладать матрикс, является его способность поддерживать адгезию и пролиферацию различных клеток органов и тканей. Многие материалы, включая синтетические полимеры, биокерамику, металлы, такими свойствами не обладают вследствие отсутствия взаимодействий с клетками по принципу лиганд-рецептор [25].

Для придания поверхности матрикса свойств, способствующих специфическому взаимодействию с культивируемыми клетками, применяют различные методы модифицирования [26–29]. Наибольшее распространение получила ковалентная иммобилизация биологически активных веществ (БАВ), в основном поли- и олигосахаридов, пептидов и белков, ответственных за адгезивные свойства, таких как RGD-пептид (Arg-Gly-Asp) и соединения на его основе [26, 30]. Помимо адгезионных пептидов на поверхности 3D-матриксов нередко иммобилизуют разнообразные факторы роста [31–33], а также сигнальные агенты, способствующие дифференциации клеток [34]. Тем не менее подходы к оптимизации взаимодействия 3D-матриксов с клетками за счет прочной (ковалентной) фиксации на их поверхности БАВ не лишены серьезных недостатков. Основным из них следует признать частичную или полную потерю иммобилизованными агентами своей активности в результате фиксации в непосредственной близости от поверхности [26]. Так, адсорбированный интерлейкин-1 стимулирует дифференциацию моноцитов, в то время как ковалентно-иммобилизованный эту способность утрачивает [35]. Другим способом формирования на поверхности 3D-матриксов биоактивных покрытий может быть нековалентное взаимодействие между биоактивной молекулой и подложкой [20, 36–38]. Основным недостатком таких покрытий является их низкая устойчивость

в условиях контакта с биологическими средами. Для улучшения их адгезионной стабильности применяют обработку сшивающими агентами, что нередко отрицательно сказывается на биологической активности покрытий [28]. Кроме того, покрытия, основанные на адсорбции или ионном связывании с поверхностью матрикса, нельзя нагрузить БАВ в концентрации, обеспечивающей достаточное их функционирование.

На наш взгляд, перспективными для создания *in situ* ТИК хрящевой ткани могут быть тканеспецифические мелкодисперсные гранулы, полученные из хрящевых (коллагеноподобных) мембран, выделенных из оболочки диафрагмы 3-месячных бычков и содержащих, главным образом, коллаген 2-го типа, основного белкового компонента хряща (рис. 4).

Ускоренные испытания биодеструкции образцов трех фракций мелкодисперсного биоматрикса (МБМ) в модельной среде «фосфатный буфер (ФБ) + коллагеназа», показали, что в отличие от деструкции ФБ потеря массы всех фракций МБМ протекает с постоянной скоростью в течение всего времени эксперимента (7 суток). При изменении среднего размера частиц от 230 до 480 мкм и более потеря массы на 7-е сутки эксперимента составляет $52,7 \pm 2,8\%$ для МБМ со средним размером частиц 230 мкм; $39,4 \pm 3,1\%$ для МБМ со средним размером частиц 230–480 мкм и $33,2 \pm 4,2\%$ для МБМ со средним размером частиц 480–510 мкм. Заметим, что для нефракционированного образца аналогичное значение равно $36,3 \pm 4,5\%$.

Проведенные биологические исследования образцов МБМ *in vitro* в соответствии с разработанной программой испытаний, соответствующей системе стандартов ГОСТ ИСО 10993 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий» для имплантируемых изделий» [39], показали соответствие всех образцов мелкодисперсного биоматрикса требованиям стандартов биологической безопасности ГОСТ ИСО 10993.



Рис. 4. Микрофотография гранул МБМ в набухшем состоянии со средним размером частиц от 230 до 480 мкм

Исследование матричных (функциональных) свойств биоматриков по метаболической активности фибробластов мышцы линии NIH 3T3 на поверхности экспериментальных образцов мелкодисперсных биоматриков показало, что образцы всех трех фракций стимулируют процессы прикрепления и пролиферации клеток. Тем не менее самая мелкодисперсная фракция (МБМ со средним размером частиц 230 мкм) обеспечивает более интенсивную и продолжительную пролиферацию клеточной культуры. Таким образом, полученные результаты по биостабильности, цитотоксичности и матричным (функциональным) свойствам мелкодисперсных биоматриков позволяют прийти к заключению о перспективности применения разработанных мелкодисперсных биоматриков для пластической хирургии и тканеинженерной конструкции хряща.

Микроструктурированные биополимерные гидрогелевые матрицы с антиоксидантной и антирадикальной активностью

Одним из важнейших аспектов развития исследований и технологий в области создания тканеинженерных конструкций (ТИК) для регенеративной медицины и трансплантологии является обеспечение выживания и необходимых функциональных свойств клеток в составе ТИК.

В том числе необходимо учитывать немаловажное влияние различных биологически активных веществ, продуцируемых в организме в ходе ответной реакции, на имплантацию тканеинженерной конструкции на жизнедеятельность ее клеточной компоненты. Одним из явлений, наблюдаемых для указанных состояний, является оксидативный стресс, характеризующийся, в первую очередь, высоким содержанием соединений, вступающих в реакции по свободно-радикальному механизму [40, 41]. К таким соединениям относятся, например, активные формы кислорода (АФК) – супероксид-аниона, пероксида водорода, гидроксильного радикала, пергидроксильного радикала и др. Свободные радикалы, накапливающиеся в клетке, способны оказывать крайне негативное влияние в первую очередь на мембранные структуры, окисляя липиды мембран, содержащие ненасыщенные связи. Самые активные свободные радикалы могут повреждать молекулы ДНК, вызывать окислительную деструкцию митохондрий.

В здоровом организме действие свободных радикалов нейтрализуется репаративной системой. Однако при патологических состояниях ее активность снижается, и подавление оксидативного стресса становится возможным только при введении веществ с антиоксидантной и антирадикальной активностью.

Вследствие вышесказанного нам представляется перспективным создание тканеинженерных конструкций с включением в них компонентов с антиоксидантной и антирадикальной активностью.

В свете вышесказанного в качестве основы для создания биополимерного микроструктурированного гидрогелевого матрикса (БМГМ), содержащего биологически активные субстанции с антирадикальной и антиоксидантной активностью, была выбрана композиция гетерогенного имплантируемого геля из линейного ряда *Сферо*[®]ГЕЛЬ (производство ЗАО «БИОМИР сервис», Россия) со следующими характеристиками:

- средний размер микрочастиц – $145,79 \pm 0,09$;
- модуль упругости – 1170 ± 12 Па;
- модуль вязкости – $62,9 \pm 7,9$ Па;
- набухаемость – не ниже $86,6 \pm 3,0$ мас. %.

Среди большого количества антиоксидантов природного и синтетического происхождения [41] нами был выбран дигидроквертицин (ДГК) – $C_{15}H_{12}O_7$, как наиболее изученное соединение из класса флавоноидов растительного происхождения. Ввиду уникальности его свойств как перехватчика свободных радикалов и комплексообразователя ДГК относят к эталонным антиоксидантам. Антиоксидантная активность ДГК, по некоторым данным, выше, чем у таких известных антиоксидантов, как α -токоферол, витамин С, бета-каротин, витамин Е [42, 43]. Кроме того, известно позитивное влияние ДГК на многие процессы в организме. Например, его сосудоукрепляющее действие, ранозаживляющие свойства [44]. Весь спектр биологических свойств ДГК еще не исследован до конца, однако существуют данные о его влиянии на клеточные процессы, в частности на механизмы дифференцировки клеток [43–45].

Учитывая целый ряд проблем технологического характера при создании биополимерных микроструктурированных гидрогелевых матриков, обладающих антирадикальной и антиоксидантной активностью, решено было использовать липосомальную форму дигидроквертицина [45], полученного из древесины лиственницы сибирской и лиственницы даурской [46].

При изготовлении экспериментальных образцов биополимерных микроструктурированных гидрогелевых матриков, модифицированных дигидроквертицином (БМГМ–ДГК), использовали липосомальную форму ДГК – антиоксидантно-фосфолипидный комплекс (ООО «Научная компания «Фламена», Россия), который вводили в объем гидрогеля методом высокоскоростного перемешивания. Антиоксидантно-фосфолипидный комплекс (АФК) содержит ДГК, инкапсулированный в наноразмерные липосомы, что позволяет обеспечить стабильность его антиоксидантных свойств во времени и пролонгированный эффект. Полученные экспериментальные

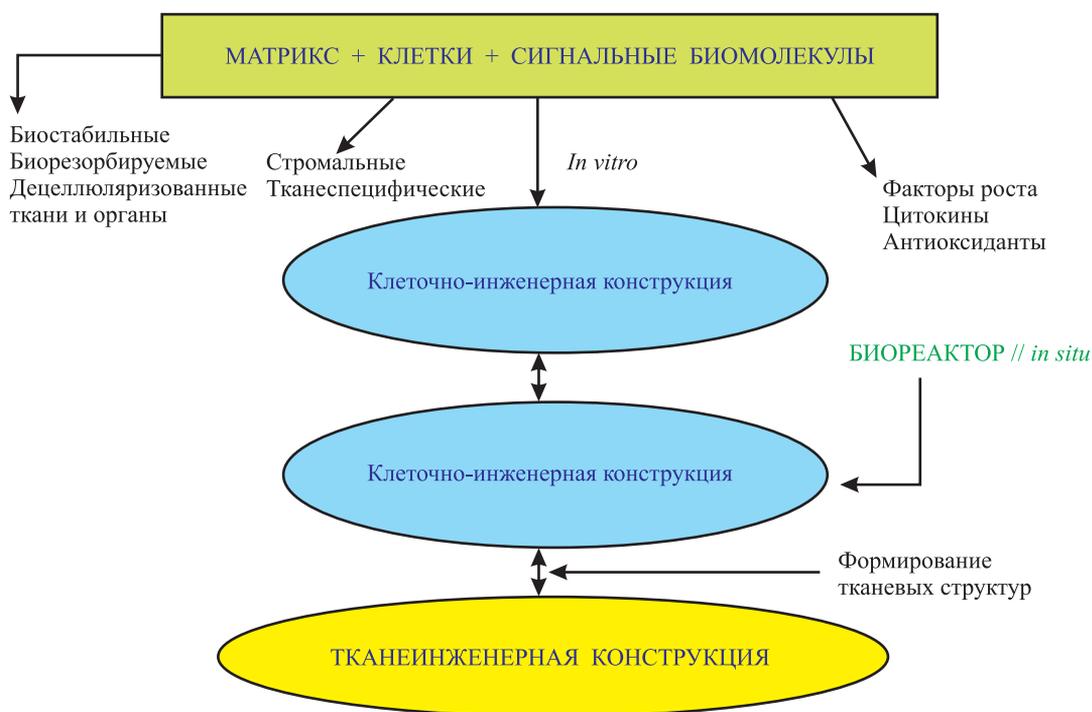


Рис. 5. Формирование тканеинженерных конструкций с использованием биореактора или живого организма (*in situ*)

образцы БМГМ-АФК с концентрациями АФК – 1, 3 и 5% оценивали по следующим основным показателям физико-химических свойств:

- содержание действующего вещества;
- наличие и фракционный состав микросфер;
- стабильность фракционного состава во времени;
- оценка антиоксидантной активности ДГК;
- наличие остаточного количества растворителей;
- уровень pH;
- метаболическая активность фибробластов мыши линии NIH 3T3 на поверхности БМГМ-АФК.

Контролем была культура клеток фибробластов той же линии и в той же посевной дозе, растущая в полной ростовой среде.

Сравнительный анализ показателя метаболической активности образцов БМГМ-АФК в условиях данного эксперимента показал отсутствие ингибирующего эффекта АФК при его концентрациях 3 и 5%, в отличие от 1%, и наличие достоверной стимуляции пролиферативной активности исследованной клеточной культуры при 5% АФК. Полученные предварительные результаты позволяют надеяться на перспективность предложенного способа модифицирования биополимерных микроструктурированных гидрогелевых матриц, направленного на улучшение их функциональных (матричных) свойств.

ТЕХНОЛОГИИ ТКАНЕВОЙ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Существует два основных подхода к созданию тканеинженерных конструкций (рис. 5). Первый



Рис. 6. Общий вид биореактора для тканевой инженерии, модель ORCA (Harvard Apparatus, США)

связан с использованием специального устройства – биореактора, обеспечивающего условия для дифференциации и пролиферации клеток с последующим формированием тканевых структур (рис. 6).

Второй путь заключается в использовании в качестве биореактора организма реципиента и при возможности формирование тканеинженерных конструкций *in situ*.

Тканеинженерная конструкция хрящевой ткани

В последнее время для получения эквивалента хрящевой ткани разрабатывают тканеинженерные конструкции с применением различных трехмерных полимерных матриц [47, 48].

В проведенных нами экспериментальных исследованиях в условиях *in vivo* и *in vitro* была доказана перспективность данного подхода для формирования тканеинженерной конструкции хрящевой ткани (ТИКХТ) в условиях *in situ* при имплантации клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани (КИКХТ), состоящей из биополимерного микроструктурированного гидрогелевого матрикса (БМГМ) и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСКЖТч) [49, 50].

Было доказано, что оптимальными условиями формирования ТИК ХТч *in vitro* являются хондрогенная дифференцировка МСКЖТч в процессе культивирования непосредственно в БМГМ при плотности посева 2×10^6 кл/мл матрикса. При культивировании КИКХТ выбранного состава (БМГМ, МСКЖТч, хондрогенная среда) к 42-м суткам хондрогенной дифференцировки наблюдали увеличение клеточной массы, прорастание клеток в толщу БМГМ и увеличение количества внеклеточного матрикса, вырабатываемое клетками. Клетки актив-

но пролиферировали и вырабатывали компоненты собственного внеклеточного матрикса, в частности, гликозаминогликаны (ГАГ) и коллаген 2-го типа, которые постепенно замещали резорбирующий гидрогелевый матрикс (фиолетовая окраска) к коллагену человека II типа, что может говорить о начале формирования *in vitro* тканеинженерной конструкции ХТ (рис. 7).

Эксперименты *in vivo* подтвердили возможность формирования ТИК хрящевой ткани в месте подкожной имплантации клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани. Через 28 суток в препаратах опытной группы наблюдали более выраженную по сравнению с предыдущим сроком наблюдения резорбцию биополимерного гидрогеля с замещением его рубцовой тканью (рис. 8, А). Фрагменты геля окружены гетерогенной клеточной массой с явным преобладанием фибробластоподобных клеток, в некоторых участках формирующих соединительно-тканную капсулу. Выявлено прогрессивное увеличение массы коллагеновых волокон (рис. 8, Б) и

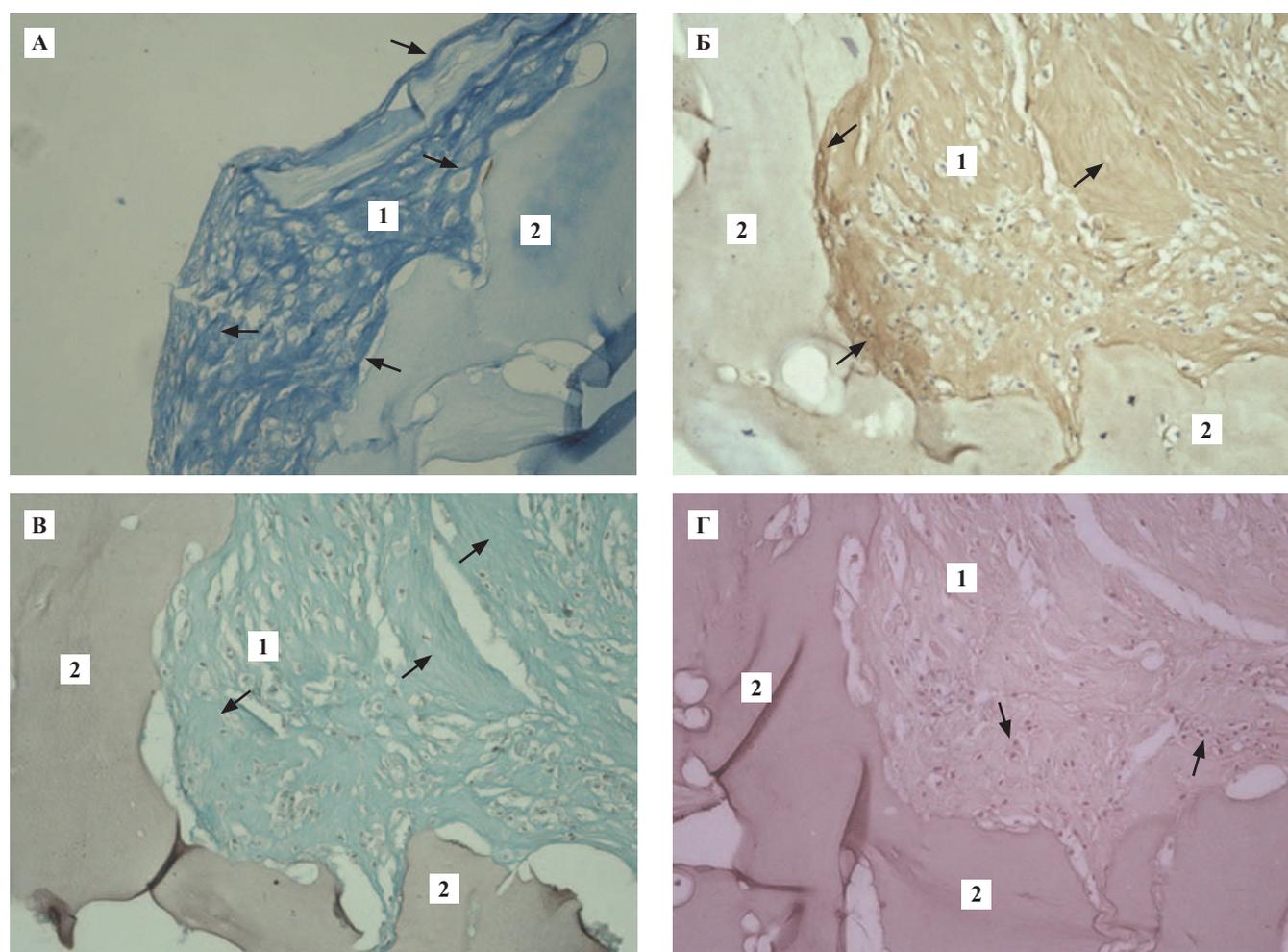


Рис. 7. Формирование ТИК хрящевой ткани из КИКХТ, состоящей из БМГМ и МСКЖТч, 42-е сутки хондрогенной дифференцировки: А – окрашивание на коллаген по методу Маллори (указано стрелками); Б – иммуногистохимическое окрашивание антителами к коллагену человека II типа (показано стрелками); В – окрашивание альциановым синим на гликозаминогликаны (указано стрелками); Г – лакуноподобные структуры (изогенные группы клеток показаны стрелками), окрашивание гематоксилином и эозином. 1 – МСКЖТч; 2 – БМГМ. $\times 200$ [50]

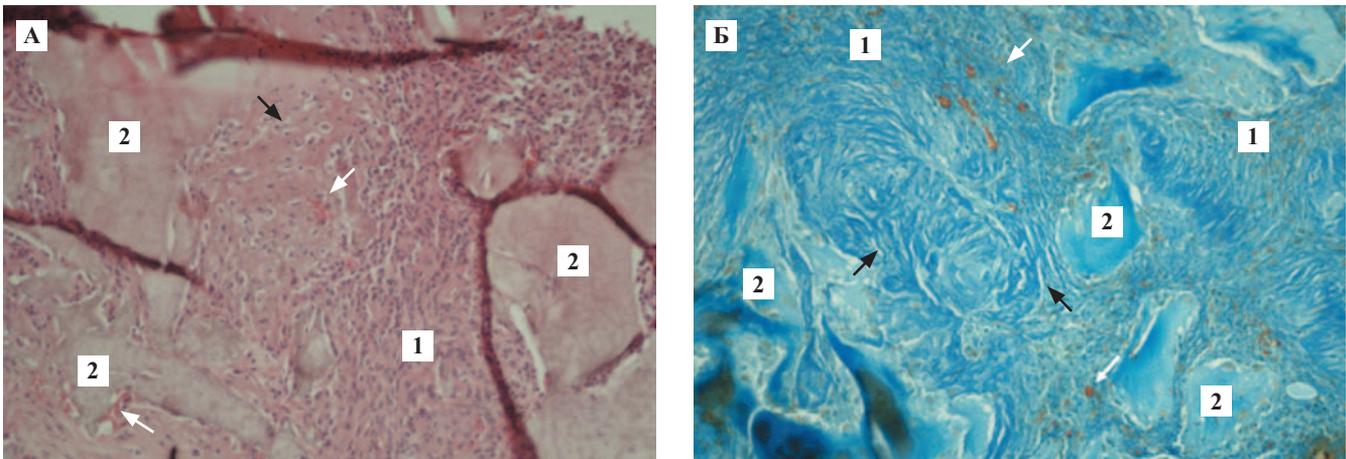


Рис. 8. 28 суток подкожной имплантации КИКХТ, состоящей из БМГМ и МСКЖТч: А – окрашивание гематоксилином и эозином (черными стрелками указаны лакунообразные структуры); Б – окрашивание на collagen по методу Маллори (указано черными стрелками): 1 – гетерогенная клеточная популяция; 2 – БМГМ, капилляры указаны белыми стрелками. $\times 200$ [50]

локальное сине-зеленое окрашивание, характерное для ГАГ. В отдельных участках имплантата встречаются немногочисленные лакунообразные структуры, характерные для хрящевой ткани (рис. 8, А). Можно предположить, что на более поздних сроках собственный внеклеточный матрикс ТИКХТ постепенно заместит резорбирующийся временный биополимерный матрикс с образованием полностью биологической хрящевой ткани.

Тканеинженерная конструкция печени

В многочисленных работах для создания ТИК печени привлекают различной природы 2D- и 3D-матрицы, включая децеллюляризованную печень, и клеточные компоненты из разных источников [51].

Проведенная серия исследований по созданию инъекционной тканеинженерной конструкции печени показала перспективность использования живого организма как биореактора для формирования *in situ* тканеинженерной конструкции печени [52–57]. КИК печени, состоящую из БМГМ и сокультивированных аллогенных клеток печени и МСК костного мозга крыс в соотношении 5:1 (рис. 9), имплантировали в паренхиму печени крысы через 7 суток после завершения моделирования хронического токсического фиброзирующего повреждения печени (затравка крыс CCl_4 в течение 42 суток). На 7-е сутки после окончания затравки наблюдали четко выраженные признаки фиброза (появление ложных долек печени). В контрольной группе крыс, которым вводили физиологический раствор, к 90-м суткам после окончания затравки наблюдали дальнейшее разрастание соединительной ткани и формирование внутридолькового фиброза с циррозом печени к 180-м суткам (рис. 10).

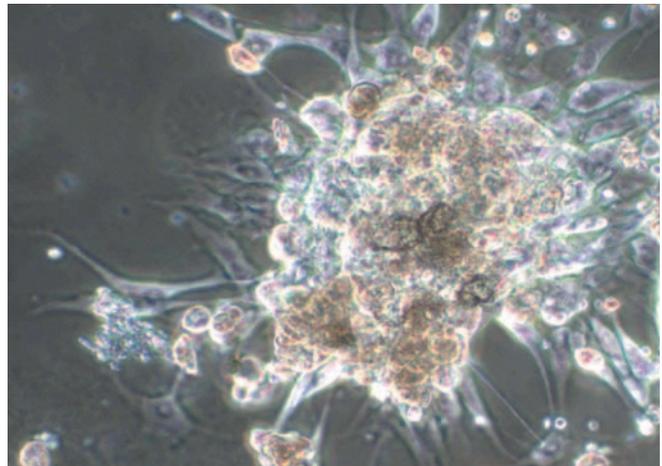


Рис. 9. Третьи сутки сокультивирования клеток печени и ММСК КМ. Образование ассоциата печеночных клеток. Фазово-контрастная микроскопия. $\times 200$ [57]

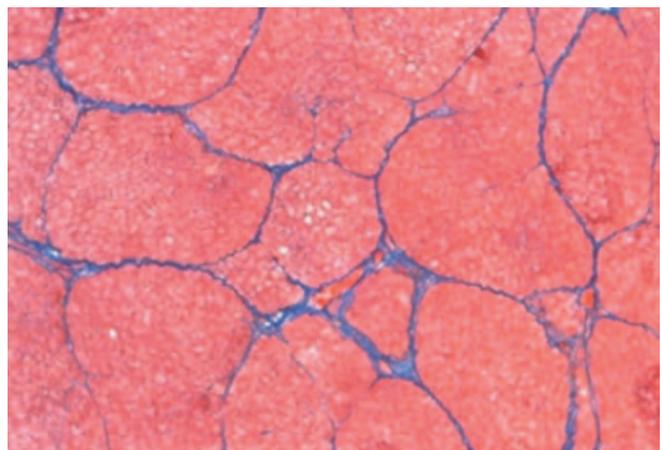


Рис. 10. Гистологическая картина ткани печени через 180 суток после завершения моделирования хронического токсического фиброзирующего повреждения печени (затравка крыс CCl_4 в течение 42 суток). Окраска на соединительную ткань по Маллори. Ложные дольки, цирроз. $\times 250$ [57]

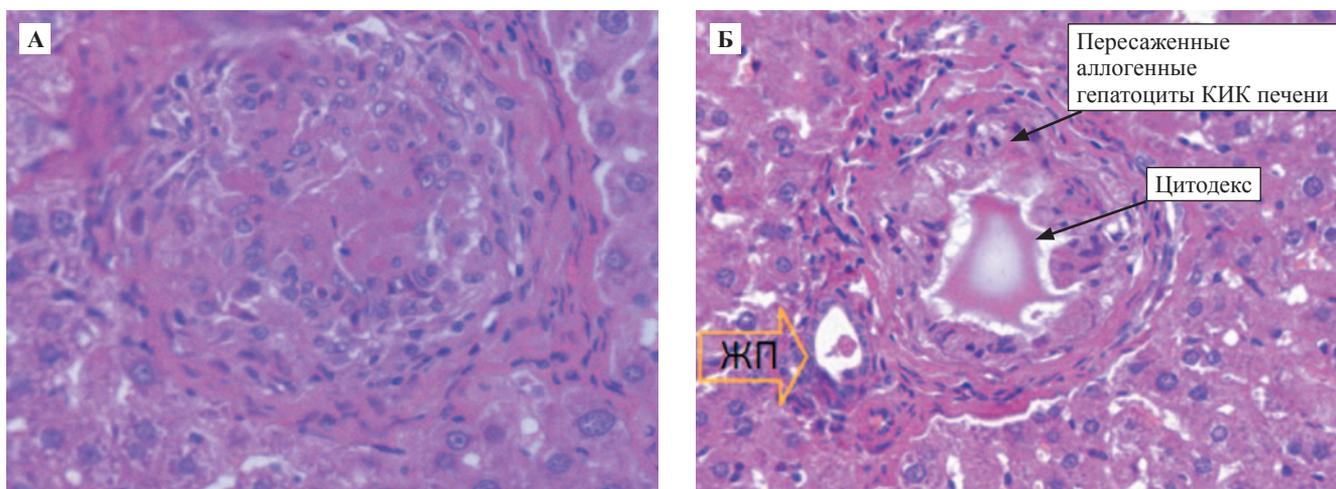


Рис. 11. Состояние клеточно-инженерных конструкций, содержащих ассоциаты клеток печени и ММСК КМ, через 90 суток после их трансплантации в поврежденную печень экспериментальных животных: А – жизнеспособные клетки донорской печени в структуре трансплантированной клеточно-инженерной конструкции; В – образованные желчные протоки (ЖП) по периферии клеточно-инженерной конструкции. Окраска гематоксилином-эозином. ×400 [57]

Напротив, в экспериментальной группе животных через 90 суток в клеточных структурах имплантированных клеточно-инженерных конструкций отмечался высокий уровень гликоген-аккумулирующей активности гепатоцитов, а сами конструкции оказываются функционирующими и полностью интегрированными печеночной тканью реципиента (рис. 11). Через 180 суток имплантации клеточно-инженерные конструкции были полностью интегрированы печеночной тканью реципиента с образованием новых функционирующих кровеносных сосудов и желчных протоков (рис. 12). Проведенные биохимические и гистологические исследования показали, что имплантация предложенных клеточ-

но-инженерных конструкций в паренхиму печени способствует дефиброзированию ткани поврежденной печени и нормализации показателей функции печени по сравнению с контролем.

Тканеинженерная конструкция поджелудочной железы

В отличие от биоинженерных хрящевой ткани и печени работы по созданию ТИК многочисленны [58]. В качестве матриц используются главным образом гидрогелевые матриксы, содержащие коллаген.

В качестве первого шага создания тканеинженерной конструкции поджелудочной железы явилось исследование влияния БМГМ на флотирующие культуры островковых клеток (ОК) [59]. Флотирующие культуры ОК, полученные из поджелудочной железы новорожденных кроликов, засеивали на поверхность биоматрикса, заливали ростовой средой и помещали в инкубатор. Изменения, происходившие с 3D-биоматриksom и ОК, фиксировали с помощью инвертированного микроскопа и гистологических исследований, включая гистохимический анализ.

При совместной, достаточно длительной (2 недели) инкубации культур ОК и БМГМ во флотирующих микрофрагментах не выявлялось выраженных деструктивных изменений, и с помощью иммуногистохимического окрашивания подтверждалось сохранение значительного количества гормонально-активных ОК как на 7-е, так и 14-е сутки сокультивирования. Это свидетельствовало, по меньшей мере, об отсутствии отрицательного влияния 3D-биоматрикса на выживаемость и морфофункциональные качества культур ОК. При этом отме-

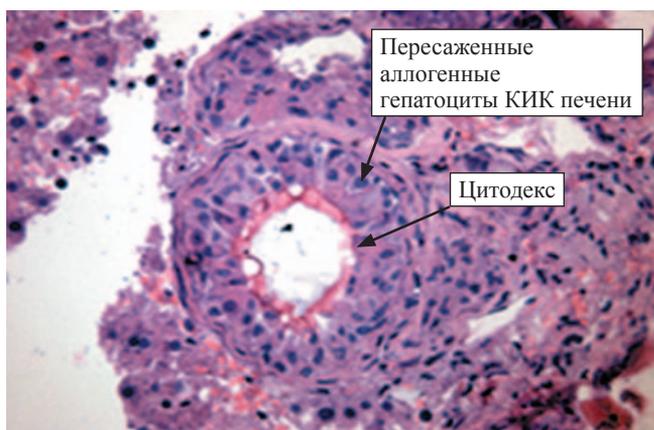


Рис. 12. Гистологическая картина после имплантации клеточно-инженерной конструкции (КИК) печени на 180-е сутки (экспериментальная модель хронического токсического фиброзирующего повреждения печени крысы). Интеграция пересаженных аллогенных клеток печеночной тканью реципиента с исчезновением признаков фиброза. Окраска гематоксилином и эозином. ×400 [57]

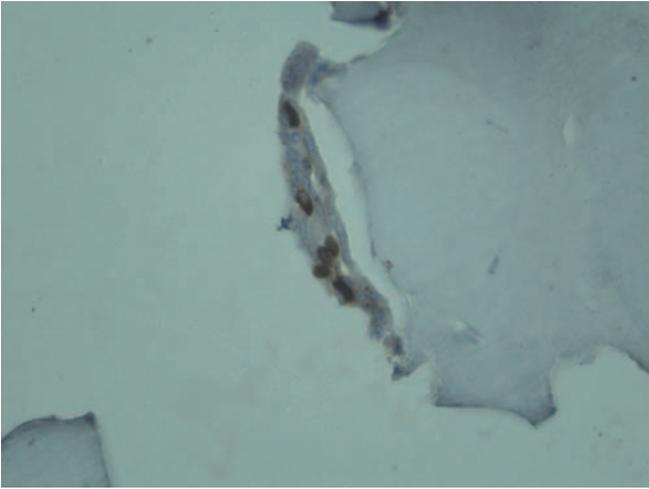


Рис. 13. Прикрепление флотирующей культуры к биоматриксу. Иммунопозитивное окрашивание бета-клеток антителами к инсулину. $\times 400$ [59]

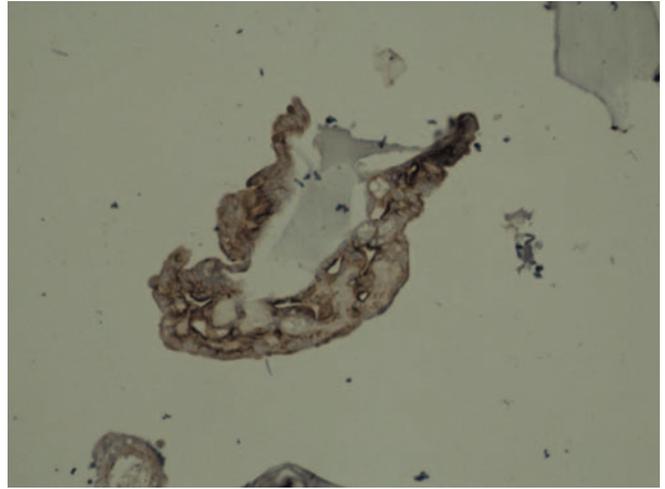


Рис. 14. Культура, прикрепленная к биоматриксу. Иммунопозитивное окрашивание на цитокератин 19. $\times 200$ [59]

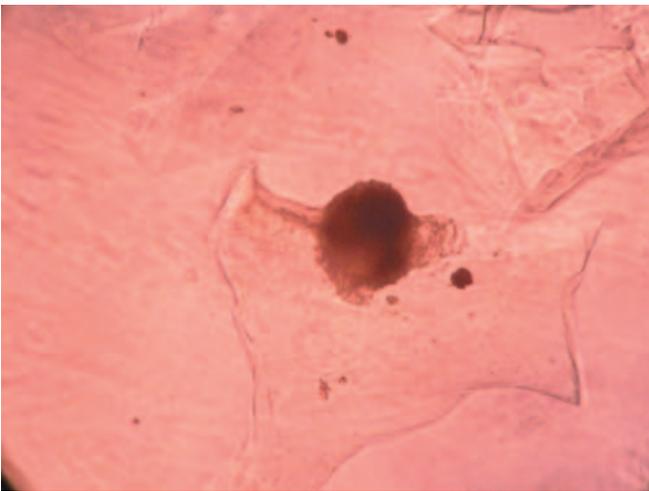


Рис. 15. Прикрепление флотирующей культуры островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов к биоматриксу. $\times 200$ [59]

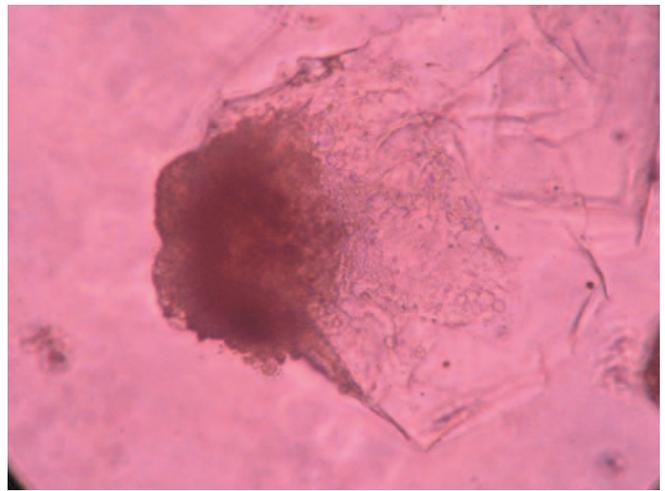


Рис. 16. Формирование однослойной культуры вокруг очага прикрепления флотирующей культуры островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов к биоматриксу. $\times 400$ [59]

чалось прикрепление таких культур к поверхности биоматрикса (рис. 13). Часть прикрепившихся к биоматриксу флотирующих культур содержали значительное количество клеток, демонстрировавших позитивную реакцию при окрашивании антителами к цитокератину 19 – специальному маркеру протокового эпителия (рис. 14).

Одновременно в процессе совместной инкубации культур и БМГМ вокруг части прикрепившихся культур ОК формировались эпителиподобные однослойные зоны роста (рис. 15, 16). На основании ранее проведенных нами исследований можно с большой долей вероятности предположить, что эти клетки, происходящие из протокового эпителия, являются прогениторными клетками поджелудочной железы, то есть предшественниками ОК. В контрольном опыте инкубации флотирующих куль-

тур ОК (без БМГМ) не наблюдалось формирования однослойных зон роста вокруг очагов прикрепления флотирующих культур ко дну культурального флакона.

Таким образом, гидрогелевый коллагенсодержащий 3D-биоматрикс способствует длительному сохранению морфофункциональных свойств флотирующих культур ОК и росту прогениторных клеток поджелудочной железы в условиях *in vitro* и может быть использован в качестве инъекционного носителя при создании тканеинженерной конструкции поджелудочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной акцент исследований в области тканевой инженерии и регенеративной медицины, прово-

димых в ФГБУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» совместно с рядом научных учреждений в последние 5 лет, был сделан на разработке инъекционных форм тканеинженерных конструкций (ТИК) печени и поджелудочной железы, созданных на основе разрешенного к клиническому применению биоактивного биополимерного гидрогелевого матрикса, соответствующих ассоциатов специализированных клеток и мезенхимальных стромальных клеток. Суть этих разработок, защищенных 6 патентами, заключается в формировании тканеинженерных конструкций из введенных эндоскопическим способом инъекционных форм соответствующих клеточно-инженерных конструкций. Проведенные на экспериментальных моделях доклинические исследования доказали функциональную эффективность инъекционных форм КИК хрящевой ткани и печени. Также были получены положительные результаты функциональной активности инъекционной формы КИК поджелудочной железы в условиях *in vitro*.

Отличительной чертой разработанных инъекционных форм ТИК с ярко выраженными регенераторными свойствами является возможность использования самого организма экспериментальных животных, а затем и человека в качестве биореактора, что позволяет существенно упростить технологию «выращивания» органа и уменьшить риск нежелательных осложнений.

В то же время проведенные предварительные исследования позволяют считать, что инъекционные формы недостаточно эффективны, например, при терминальных стадиях заболеваний или при оказании экстренной медицинской помощи, когда требуется немедленное функционирование большой массы клеточного материала. Это диктует необходимость разработки каркасной формы биоинженерной печени или поджелудочной железы как для временной или постоянной замены пораженного органа, так и в качестве эффективных биологически совместимых экстракорпоральных систем.

В настоящее время ФНЦТИО совместно с Институтом проблем лазерных и информационных технологий РАН при финансовой поддержке РФФИ начали инициативные работы по созданию матриц для каркасных моделей хряща, биоинженерной печени и поджелудочной железы [18, 19]. Разрабатываемые биоинженерные органы будут представлять собой ремоделированный с использованием методов быстрого прототипирования и сверхкритических флюидных технологий [13, 60] прототип каркаса децеллюляризованного органа из биосовместимого материала, заполненный ассоциатами специализированных и стромальных клеток с последующим формированием в биореакторе биоискусственного органа.

Исследования по выбору оптимальных материалов для ремоделирования каркаса нативного органа планируется проводить одновременно с использованием трех классов различных полимеров:

- биостабильных синтетических полимеров;
- резорбируемых синтетических полимеров;
- резорбируемых биополимеров.

Предлагаемый подход к созданию биоинженерных органов пока не имеет аналогов в России и находится в одном ряду с передовыми идеями научных групп США, Германии, Великобритании и Японии, активно ведущих исследования в этом направлении.

И в заключение сотрудники отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии поздравляют весь коллектив Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова с 45-летним юбилеем.

Исследования проведены при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов 13-04-12017 офи_м, 13-02-12215 офи_м, 13-02-12041 офи_м и гранта Президента РФ № НШ-6294.2014.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Atala A, Lanza R, Thompson J, Nerem R.* Principles of regenerative medicine. Academic Press is an imprint of Elsevier, First edition. 2008.
2. *Advances in replacement organs and tissue engineering.* Technical Insights, Frost & Sullivan. 2008.
3. *Биология стволовых клеток и клеточные технологии.* Под ред. Пальцева МП. Т. 2. М.: Медицина, 2009: 456. *Stem cell biology and cell technologies.* Ed. by: Pal'cev MP. M.: Medicina, 2009: 456
4. *Stem cell technology: current applications and future directions.* BCC Research. New York, 2008.
5. *Kirschstein R, Skieboll LR.* Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions, National Institute of health, Washington DC. 2001.
6. *Репин ВС, Ржанинова АА, Шаменков ДА.* Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. М.: Реметекс, 2002: 184. *Repin VS, Rzhaniнова AA, Shamenkov DA.* Embryonic stem cells: fundamental biology and medicine. M.: Remetek, 2002: 184.
7. *Биосовместимые материалы (учебное пособие).* Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011: 544. *Biocompatible materials (textbook).* Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. M.: MIA, 2011: 544.
8. *Сургученко ВА.* Матрицы для тканевой инженерии и гибридных органов. *Биосовместимые материалы (учебное пособие).* Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 2 (1): 199–228. *Surguchenko VA.* The matrices for tissue engineering and hybrid organs. *Biocompatible materials (textbook).* Ed.

- by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. M.: MIA, 2011; 2 (1): 199–228.
9. Василец ВН. Методы изготовления матриксов. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 2 (1): 229–236. *Vasilets VN. Methods of scaffolds production. Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. M.: MIA, 2011; 2 (1): 229–236.
 10. Медведев ДД, Недосеев СЛ, Нистратов ВМ, Смирнов ВП, Петяев ВА, Шварцкопф ПВ и др. Плазмообразующие полимерные среды для инерциального термоядерного синтеза и биоинженерии. *Вопросы атомной науки и техники. Сер. Термоядерный синтез*. 2010; 1: 22–31. *Medvedev DD, Nedoseev SL, Nistratov VM, Smirnov VP, Petjaev VA, Shvarckopf PV et al. Plasma polymer environment for inertial fusion and bioengineering. Problems of atomic science and technology. Thermonuclear fusion series*. 2010; 1: 22–31.
 11. Агапов ИИ, Мойсенович ММ, Васильева ТВ, Пустовалова ОЛ, Коньков АС, Архипова АЮ и др. Биодegradуемые матриксы из регенерированного шелка для медицинских целей. *Доклады Академии наук*. 2010; 433 (5): 1–4. *Agapov II, Mojsenovich MM, Vasil'eva TV, Pustovalova OL, Kon'kov AS, Arhipova AJu et al. Biodegradable scaffolds from recycled silk for medical purposes. Reports of the Academy of Sciences*. 2010; 433 (5): 1–4.
 12. Попов ВК. Имплантаты в заместительной и регенеративной медицине костных тканей. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 2 (4): 253–294. *Popov VK. Implants in bone tissue substitution and regenerative medicine. Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. M.: MIA, 2011; 2 (4): 252–294.
 13. Moisenovich MM, Pustovalova OL, Arhipova AYu, Vasiljeva TV, Sokolova OS, Bogush VG et al. In vitro and in vivo Biocompatibility Studies of a Recombinant Analogue of Spidroin 1 Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Research*. 2010; 96A (1): 125–131.
 14. Заитов ЛМ, Недосеев СЛ, Василец ВН, Севастьянов ВИ. Способ изготовления пористого матрикса. Патент РФ № 2428172 (2011). *Zaitov LM, Nedoseev SL, Vasilets VN, Sevastianov VI. A method of porous matrix manufacturing. Russian Federation patent № 2428172 (2011)*.
 15. Недосеев СЛ, Нистратов ВМ, Василец ВН, Севастьянов ВИ. Способ обработки пористых полимерных материалов. Патент РФ № 2426607 (2011). *Nedoseev SL, Nistratov VM, Vasilets VN, Sevastianov VI. Sposob obrabotki poristyx polimernyx materialov. Russian Federation patent № 2426607 (2011)*.
 16. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент РФ № 2433828 (2011). *Sevastianov VI, Perova NV. Injecting heterogeneous biopolymer hydrogel for replacement therapy and regenerative surgery and how to obtain it. Russian Federation patent № 2433828 (2011)*.
 17. Богородский СЭ, Кротова ЛИ, Минаева СА, Мишаков ГВ, Попов ВК, Басок ЮБ, Севастьянов ВИ. Сверхкритическая флюидная микронизация и инкапсуляция ибупрофена в микрочастицы алифатических полиэфигов. *Перспективные материалы*. 2013; 1: 23–32. *Bogorodskij SJe, Krotova LI., Minaeva SA, Mishakov GV, Popov VK, Basok JuB, Sevastianov VI. Supercritical fluid micronization and encapsulation of ibuprofen in aliphatic polyesters microparticles. Perspective materials*. 2013; 1: 23–32.
 18. Богородский СЭ, Василец ВН, Кротова ЛИ, Минаева СА, Миронов АВ, Немец ЕА и др. Формирование биоактивных высокопористых полимерных матриксов для тканевой инженерии. *Перспективные материалы*. 2013; 5: 44–54. *Bogorodskij SJe, Vasilets VN, Krotova LI, Minaeva SA, Mironov AV, Nemets EA et al. The formation of bio-active highly porous polymeric matrices for tissue engineering. Perspective materials*. 2013; 5: 44–54.
 19. *Bogorodskij SJe, Vasilets VN, Krotova LI, Minaeva SA, Mironov AV, Nemets EA et al. Formation of bioactive highly porous polymer matrices for tissue engineering. Inorganic Materials: Applied Research*. 2013; 4 (5): 448–456.
 20. Шумаков ВИ, Севастьянов ВИ. Биополимерные матриксы для искусственных органов и тканей. *Здравоохранение и медицинская техника*. 2003; 4: 30–33. *Shumakov VI, Sevastianov VI. Biopolymer matrices for artificial organs and tissues. Health care and medical technology*. 2003; 4: 30–33.
 21. Севастьянов ВИ, Перова НВ, Немец ЕА, Сургученко ВА, Пономарева АС. Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 2 (3): 237–252. *Sevastianov VI, Perova NV, Nemets EA, Surguchenko VA, Ponomareva AS. Primery eksperimetal'no-klinicheskogo primeneniya biosovmestimyx materialov v regenerativnoy meditsine. Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. M.: MIA, 2011; 2 (3): 237–252.
 22. Федяков АГ, Древаль ОН, Севастьянов ВИ, Перова НВ, Кузнецов АВ, Чанандзе ГН. Экспериментально-клиническое обоснование применения биодegradуемых имплантатов в хирургическом лечении поражений периферических нервов. *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко*. 2010; 3: 15–18. *Fedjakov AG, Dreval ON, Sevastianov VI, Perova NV, Kuznecov AV, Chapandze GN. Experimental clinical ground of application of biodegradable implants in the surgical treatment of disorders of the peripheral nerves. Questions of neurosurgery named. N. N. Burdenko*. 2010; 3: 15–18.
 23. Севастьянов ВИ, Немец ЕА, Перова НВ, Шурыгин СН, Дмитриев ВБ. Применение биоактивных композитных эндопротезов при лечении грыж брюшной стенки. *Практическое пособие для вра-*

- чей. М.: Триада, 2012: 18. *Sevastianov VI, Nemets EA, Perova NV, Shurygin SN, Dmitriev VB*. Application of bioactive composite implants in the treatment of hernias of the abdominal wall. Practical manual for doctors. М.: Triada, 2012: 18.
24. *Севастьянов ВИ, Перова НВ, Сайковский РС, Соловьева ИВ*. Применение инъекционных форм биополимерных гетерогенных гидрогелей при дегенеративно-дистрофических поражениях суставов. Практическое пособие для врачей. М.: Триада, 2012: 27. *Sevastianov VI, Perova NV, Sajkovskij RS, Solov'eva IV*. The use of injectable biopolymer heterogeneous hydrogels with degenerative-dystrophic lesions of the joints. Practical manual for doctors. М.: Triada, 2012: 27.
25. *Волова ТГ, Севастьянов ВИ, Шишацкая ЕИ*. Полиоксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины. Под ред. В.И. Шумакова. Красноярск: Группа компаний «Платина», 2006: 288. *Volova TG, Sevastianov VI, Shishackaja EI*. Polioksialkanoaty – biorazrushaemye polimery dlya meditsiny. Ed. by V.I. Shumakov. Krasnoyarsk: Group of companies «Platinum», 2006: 288.
26. *Немец ЕА*. Химическое модифицирование материалов. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 4 (1): 349–358. *Nemets EA*. Chemical modification of materials. *Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. М.: МИА, 2011; 4 (1): 349–358.
27. *Василец ВН, Севастьянов ВИ*. Физические методы модифицирования полимерных материалов. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 4 (2): 359–385. *Vasilets VN, Sevastianov VI*. Physical methods for polymer materials modification. *Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. М.: МИА, 2011; 4 (2): 359–385.
28. *Немец ЕА, Севастьянов ВИ*. Иммобилизация биологически активных веществ. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 4 (3): 386–417. *Nemets EA, Sevastianov VI*. Immobilization of biologically active substances. *Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. М.: МИА, 2011; 4 (3): 386–417.
29. *Василец ВН, Севастьянов ВИ*. Нанотехнологические подходы к регулированию биологических свойств медицинских изделий. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 6 (2): 485–501. *Vasilets VN, Sevastianov VI*. Nanotechnological approaches to the regulation of the biological properties of medical products. *Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. М.: МИА, 2011; 6 (2): 485–501.
30. *Тоссе ЕЖ, Broderick АН, Murphy КС, Liliensiek SJ, Murphy CJ, Lynn CJ et al*. Functionalization of reactive polymer multilayers with RGD and an antifouling motif: RGD density provides control over human corneal epithelial cell–substrate interactions. *J. Biomed. Mater. Res.* 2012; 100A: 84–93.
31. *Hsieh Sh-C, Tang Ch-M, Huang W-T, Hsieh L-L, Lu Ch-M, Chang Ch-J, Hsu Sh-H*. Comparison between two different methods of immobilizing NGF in poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduit for peripheral nerve regeneration by EDC/NHS/MES and genipin. *J. Biomed. Mater. Res.* 2011; 99A: 576–585.
32. *Matsuda T, Kuwana M, Aomizu T, Yamagishi M, Ohtake H, Watanabe G*. Surface design for in situ capture of endothelial progenitor cells: VEGF-bound surface architecture and behaviors of cultured mononuclear cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 2013; 101B: 50–60.
33. *Gümüşderelioglu M, Dalkıranoglu S, Aydın R, Çakmak S*. A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* 2011; 98A: 461–472.
34. *Osathanon T, Ritprajak P, Nowwarote N, Manokawinchoke J, Giachelli C, Pavasant P*. Surface-bound orientated Jagged-1 enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 2013; 101A: 358–367.
35. *Hansen M, Hjortø GM, Met Ö, Jakobsen MH, Svane IM, Larsen NB*. Cell culture plastics with immobilized interleukin-4 for monocyte differentiation. *J. Biomed. Mater. Res.* 2011; 96A: 372–383.
36. *Qu D, Li J, Li Y, Khadka A, Zuo Y, Wang H et al*. Ectopic osteochondral formation of biomimetic porous PVA-n-NA/PA6 bilayered scaffold and BMSCs construct in rabbit. *J. Biomed. Mater. Res.* 2011; 96B: 9–15.
37. *Shekaran A, Garcia AJ*. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *J. Biomed. Mater. Res.* 2011; 96A: 261–272.
38. *Stadlinger B, Hintze V, Bierbaum S, Möller S, Schulz MC, Mai R et al*. Biological functionalization of dental implants with collagen and glycosaminoglycans – A comparative study. *J. Biomed. Mater. Res.* 2012; 100B: 331–341.
39. *Перова НВ, Довжик ИА*. Дифференцированный подход к оценке биологических свойств медицинских изделий. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП. М.: МИА, 2011; 5 (1): 440–454. *Perova NV, Dovzhik IA*. Differentiated approach to the assessment of the biological properties of medical products. *Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by: Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. М.: МИА, 2011; 5 (1): 440–454.
40. *Rhodes CJ*. Toxicology of the Human Environment – the critical role of free radicals. London: Taylor and Francis, 2000.
41. *Яшин ЯИ, Рыжнев ВЮ, Яшин АЯ, Черноусова НИ*. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. М.: Медицина, 2009. *Jashin JI, Ryzhnev VJu, Jashin AJ, Chernousova NI*. Natural antioxidants. Content in food products and their impact on health and ageing. М.: Medizina, 2009.

42. Уминский АА, Хавстеен БХ, Баканева БФ. Биохимия флавоноидов и их значение в медицине. Пушино: МИА, 2007. *Uminskij AA, Havsteen BH, Bakaneva BF. Biochemistry of flavonoids and their importance in medicine. Pushhino: MIA, 2007.*
43. Тюкавкина НА. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина. *Биофизика*. 1996; 41 (3): 621–623. *Tjukavkina NA. Antioxidant properties of digidrokvertsetin. Biofizika*. 1996; 41 (3): 621–623.
44. Наумов АА, Поцелуева ММ. Благоприятное действие липосомальной формы дигидрокверцетина на процесс регенерации кожи после термического ожога. *Цитология*. 2010; 52 (4): 311–316. *Naumov AA, Pospelueva MM. Blagotvornoe deystvie liposomal'noy formy digidrokvertsetina na protsess regeneratsii kozhi posle termicheskogo ozhoga. Citologija*. 2010; 52 (4): 311–316.
45. Жердев ВП, Колыванов ГБ, Литвин АА, Сариев АК, Виглинская АО, Геккиев БИ и др. Сравнительная фармакокинетика дигидрокверцетина у крыс после введения внутрь в виде субстанции и липосомального препарата «Фламена Д». *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2010; 73 (1): 23–25. *Zherdev VP, Kolyvanov GB, Litvin AA, Sariev AK, Viglinskaja AO, Gekkiev BI et al. Comparative pharmacokinetics of dihydroquercetin in rats after administration inwards in the form of the substance and of liposomal drug «Flamena D». Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija*. 2010; 73 (1): 23–25.
46. Уминский АА. Способ переработки древесины лиственницы и способ выделения нативных биофлавоноидов, полученных в процессе переработки. Патент РФ № 2165416 (2000). *Uminskij AA. Method for processing of larch wood and method of extraction of natural bioflavonoids received during processing. Russian Federation patent № 2165416 (2000).*
47. Chung C, Burdick JA. Engineering Cartilage Tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60 (2): 243–262.
48. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials*. 2005; 9: 23–32.
49. Пономарева АС, Сургученко ВА, Богданова НБ, Можейко НП, Севастьянов ВИ. Исследование дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека. *Вестник Саратовского государственного технического университета*. 2011; 1 (53): 215–220. *Ponomareva AS, Surguchenko VA, Bogdanova NB, Mozhejko NP, Sevastianov VI. The study differencirovannoe potential of mesenchymal stromal cells from human fat tissue. Vestnik Saratovskogo gosudarstvennogo tehničeskogo universiteta*. 2011; 1 (53): 215–220.
50. Сургученко ВА, Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Бубенцова ГН, Скалецкий НН, Севастьянов ВИ. On the possibility of in vitro formation of tissue-engineered construct of cartilage on the basis of cell-engineered construct composed of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Advanced Metals, Ceramics and Composites*, ed. H. Tu, K. Solntsev, R. Zhou, Yunnan Publ. Group Corp., Kunming, China, 2013: 242–245.
51. Godoy G, Hewitt NJ, Albrecht U. et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of Toxicology*. 2013; 87: 1315–1530.
52. Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенников МЕ, Севастьянов ВИ. Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент РФ № 2425645 (2011). *Gautier SV, Shagidulin MJu, Onishhenko NA, Krasheninnikov ME, Sevastianov VI. Method and grafts for the treatment of liver failure. Russian Federation patent № 2425645 (2011).*
53. Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенников МЕ, Севастьянов ВИ. Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент РФ № 2425646 (2011). *Gautier SV, Shagidulin MJu, Onishhenko NA, Krasheninnikov ME, Sevastianov VI. Method and grafts for the treatment of liver failure. Russian Federation patent № 2425646 (2011).*
54. Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенников МЕ, Севастьянов ВИ. Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент РФ № 2425648 (2011). *Gautier SV, Shagidulin MJu, Onishhenko NA, Krasheninnikov ME, Sevastianov VI. Method and grafts for the treatment of liver failure. Russian Federation patent № 2425648 (2011).*
55. Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенников МЕ, Севастьянов ВИ. Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент РФ № 2425647 (2011). *Gautier SV, Shagidulin MJu, Onishhenko NA, Krasheninnikov M.E., Sevastianov VI. Method and grafts for the treatment of liver failure. Russian Federation patent № 2425647 (2011).*
56. Shagidulin M, Onishchenko N, Krasheninnikov M, Volkova E, Avramov P, Ijinsky I et al. Treatment of chronic liver failure by transplantation of liver cells and bone marrow stem cells: 1 year experience. Proceeding of the European Society for Surgical Research, ESSR 2012, 47th Annual Congress (6–9 June 2012, Lille, France). 2012: 77–81.
57. Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенников МЕ, Ильинский ИМ, Можейко НП и др. Коррекция хронической печеночной недостаточности при трансплантации клеток печени в виде суспензии и клеточно-инженерных конструкций (экспериментальное исследование). *Вестник РАМН*. 2013; 4: 44–51. *Gautier SV, Shagidulin MJu, Onishhenko NA, Krasheninnikov ME, Il'inskij IM, Mozhejko NP et al. Correction of chronic liver failure in the transplantation of liver cells in suspension and cellular engineering (experimental study). Vestnik RAMS*. 2013; 4: 44–51.
58. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue Engineering Approaches to Cell Based Type 1 Diabetes Therapy. *Tissue Engineering Part B, Reviews*. 2013; 21 (1): 1–38.
59. Скалецкий НН, Кирсанова ЛА, Баранова НБ, Бубенцова ГН. Разработка методических подходов к полу-

чению островковых клеток на основании результатов морфологического анализа поджелудочной железы кроликов различного возраста. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2013; 4: 98–103. Skaleckij NN, Kirsanova LA, Baranova NV, Bubencova GN. Development of methodological approaches to producing islet cells on the basis of the results of morphological analysis of the pancreas rabbits different

- ages. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2013; 4: 98–103.
60. Popov VK, Evseev AV et al. Laser stereolithography and supercritical fluid processing for custom-designed implant fabrication. *J. Mater. Science: Mater. Med.* 2004; 15: 123–128.

Статья поступила в редакцию 10.07.2014 г.