

DOI: 10.15825/1995-1191-2015-2-127-130

## КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

*В.И. Севастьянов*

Отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

## CELL-ENGINEERED CONSTRUCTS IN TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE

*V.I. Sevastianov*

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

**Введение.** Основной целью статьи является краткий обзор исследований по разработке клеточно-инженерных конструкций для тканевой инженерии и регенеративной медицине, проводимых в последние пять лет в ФГБУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова».

Клеточно-инженерные конструкции (КИК) включают в себя следующие компоненты [1]:

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

Существует два основных подхода к созданию клеточно- или тканеинженерных конструкций, относящихся к биомедицинским клеточным продуктам. Первый связан с использованием специального устройства – биореактора, обеспечивающего условия для дифференциации и пролиферации клеток с последующим формированием тканевых структур. Второй путь заключается в использовании в качестве биореактора организма реципиента и при возможности формирование тканеинженерных конструкций *in situ*, который и был выбран для создания КИК как биомедицинского клеточного продукта для регенерации суставного хряща, печени и поджелудочной железы.

**Биополимерные гидрогелевые матриксы.** В последние годы для создания биodeградируемых 3D-матриксков все чаще стали использовать биополимеры, для изготовления которых привлекается целый ряд технологий – от простого «выщелачивания» до технологий прототипирования. Трехмерные

биорезорбируемые пористые матриксы являются каркасными элементами КИК, обеспечивающими жизнедеятельность клеток в процессе формирования определенных типов тканей. 3D-матриксы способствуют локализации клеток в области имплантации, одновременно являясь их носителями, временно выполняющими функции естественного внеклеточного матрикса.

При выборе каркаса в клеточно-инженерных конструкциях для регенерации суставного хряща, печени и поджелудочной железы мы решили остановиться на биополимерных микрогетерогенных коллагенсодержащих гидрогелях (БМКГ), получаемых методом ультрадиспергирования с последующей радиационной сшивкой. Наличие микрогетерогенной структуры гидрогеля позволило увеличить время его биodeградации до нескольких месяцев по сравнению с биоимплантатами из коллагена, рассасывающимися в течение 3–4 нед. и повышающими риск формирования рубцовой ткани.

При АСМ-анализе микрочастиц БМКГ была обнаружена пористая структура микрочастиц с размером пор 2–4 мкм, что является позитивным свойством в процессах неоваскуляризации и неиннервации тканеинженерных конструкций на основе БМКГ (рис. 1).

Варьируя степень сшивки, размер микрочастиц в геле и отношение твердой (микрочастицы) и жидкой фаз, был создан линейный ряд имплантатов, отличающихся временем биodeградации и реологическими свойствами (табл.).

Для определения размера частиц был использован лазерный анализатор микро- и наночастиц SALD-7101 с использованием приставки для высококонцентрированных растворов (коэффициент

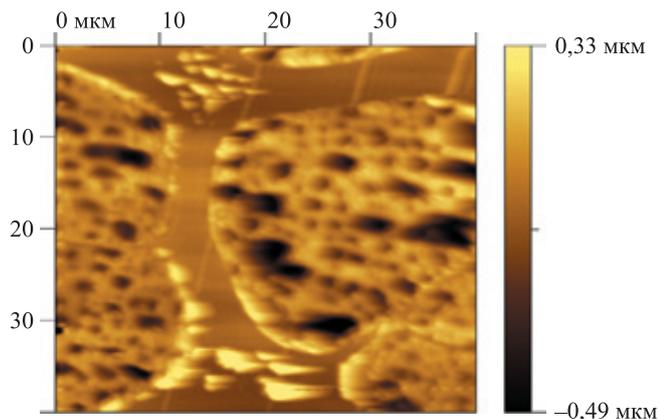


Рис. 1. АСМ-изображение микрочастиц образца БМКГ-1, полученное методом криоконсервации



Рис. 2. Инъекционная композиция биоматрикса БМКГ-1. Средний размер микрочастиц ~150 мкм

Таблица

**Характеристические параметры линейного ряда инъекционных форм композиции биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля**

Наименование композиции	Средний размер частиц, мкм	Модуль упругости, Па	Модуль вязкости, Па	Время резорбции
БМКГ-1	145,79 ± 0,09	1170 ± 12	62,9 ± 7,9	6–12 мес.
БМКГ-2	78,54 ± 0,06	97,0 ± 8,9	13,3 ± 2,4	1–3 мес.
БМКГ-3	42,31 ± 0,15	49,1 ± 4,7	17,7 ± 3,1	3 нед. – 1 мес.

преломления коллагенсодержащих растворов 1,45) на базе программного обеспечения WingSALD II: Version 2.1.0. Реологические характеристики трех различных типов инъекционного БМКГ (маркировка 1, 2, 3) были исследованы с помощью ротационного реометра Physica MCR 501 с измерительной геометрией «плита – плита», рекомендованного для измерения характеристик гелей, паст, мягких тел и расплавов полимеров.

Как видно из таблицы, БМКГ обладают ярко выраженными упругими свойствами, увеличивающимися с увеличением размера микрочастиц.

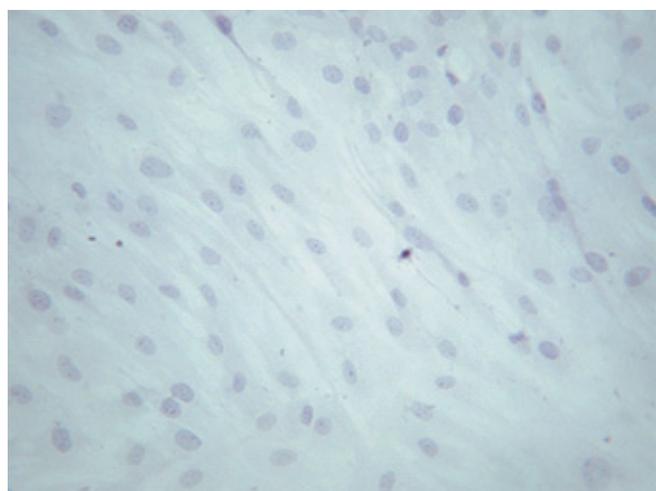


Рис. 3. Культура МСК ЖТч, 2-й пассаж,  $2 \times 10^6$  кл/мл матрикса. Окрашивание гематоксилином.  $\times 200$

Преобладание упругих свойств над вязкостными свойствами позволяет БМКГ оставаться в области его имплантации в мягкие ткани до полной резорбции, что было доказано, например, в экспериментах на крысах при имплантации в подкожно-жировую клетчатку.

В предварительно проведенных экспериментах оказалось, что из трех существующих микрогетерогенных гидрогелей для тканеинженерных конструкций суставного хряща, печени и поджелудочной железы подходит гидрогель с наибольшим размером частиц. В связи с этим для создания клеточно-инженерных конструкций был использован один и тот же матрикс БМКГ со средним размером частиц ~150 мкм (рис. 2).

**Клеточно-инженерные конструкции хрящевой ткани, печени и поджелудочной железы.** В качестве клеточного компонента для КИК хрящевой ткани человека (КИК ХТч) были выбраны мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека (МСК ЖТч, рис. 3), для КИК печени – ассоциаты сокультивированных аллогенных клеток печени крысы и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки мозга (ММСК КМ) крыс (рис. 4), для КИК поджелудочной железы – культур флотирующих островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов (рис. 5).

Функциональная активность КИК ХТч была исследована на модели адьювантного артрита с переходом в артроз (кролики породы Шиншилла).

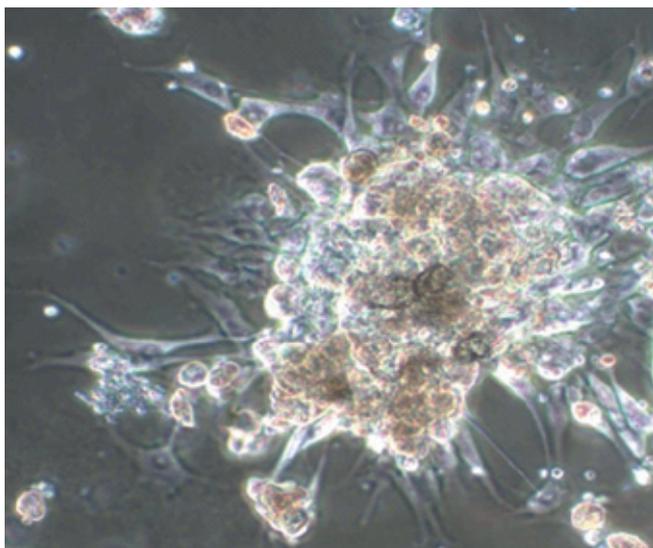


Рис. 4. Ассоциаты из сокультивированных аллогенных клеток печени и ММСК КМ в соотношении 5:1,  $3-6 \times 10^6$  кл/мл матрикса, крысы-самцы, Вистар, фазово-контрастная микроскопия.  $\times 20$

Правый сустав служил отрицательным контролем, в левый вводили КИК ХТч. В контрольных суставах (отрицательный контроль) наблюдаются изъязвления и слущивания поверхностной пластины, обеднение глубоких слоев клетками, исчезновение колончатого строения, хаотичное расположение хрящевых клеток и очаговое разволокнение хрящевого матрикса.

После введения в поврежденный сустав КИК ХТч на 60-е сут имплантации в препаратах хряща обнаруживаются признаки частичного восстановления структуры хряща, выражающиеся в формировании хондроцитами колонок-столбиков в среднем слое, некотором оживлении поверхностного слоя (увеличение количества клеток), появлении изогенных групп хрящевых клеток в матриксе. Полученный результат свидетельствует о наличии существенного регенеративного потенциала биомедицинского клеточного продукта КИК ХТч.

Для доказательства функциональной эффективности КИК печени ее имплантировали в паренхиму печени крысы через 7 сут после завершения моделирования хронического токсического фиброзирующего повреждения печени (затравка крыс  $CCl_4$  в течение 42 сут). На 7-е сут после окончания затравки наблюдали четко выраженные признаки фиброза (появление ложных долек печени). В контрольной группе крыс, которым вводили физиологический раствор, к 90-м сут после окончания затравки наблюдали дальнейшее разрастание соединительной ткани и формирование внутريدолькового фиброза с циррозом печени к 180-м сут. Напротив, в экспериментальной группе животных через 90 сут в клеточных структурах имплантированных клеточ-

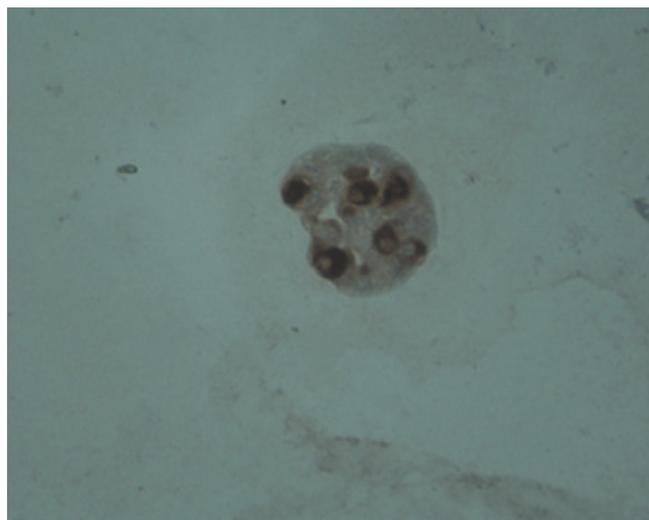


Рис. 5. 12–14-суточная флотирующая культура островковых клеток новорожденных кроликов,  $0,2-0,3 \times 10^6$  кл/мл матрикса. Иммунопозитивное (коричневое) окрашивание бета-клеток антителами к инсулину.  $\times 200$  (Скалецкий Н.Н., неопубликованные данные)

но-инженерных конструкций отмечался высокий уровень гликоген-аккумулирующей активности гепатоцитов, а сами конструкции оказываются функционирующими и полностью интегрированными печеночной тканью реципиента. Через 270 сут после имплантации клеточно-инженерные конструкции были полностью интегрированы печеночной тканью реципиента с образованием новых функционирующих кровеносных сосудов и желчных протоков. Проведенные биохимические и гистологические исследования показали, что имплантация предложенных клеточно-инженерных конструкций в паренхиму печени способствует дефибрированию ткани поврежденной печени и нормализации показателей функции печени по сравнению с контролем.

Функциональная эффективность КИК поджелудочной железы в условиях *in vivo* была исследована путем ее внутрибрюшинного введения животным (крысы, Вистар) с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа (стрептозотоциновая модель). Определяли не только сахароснижающий эффект выполненной имплантации, но и ее влияние на островковый аппарат собственной поджелудочной железы крыс-реципиентов. Было отмечено существенное снижение уровня гипергликемии, и к исходу 4–5-й нед. содержание глюкозы в крови не превышало 11 ммоль/л, субнормальный уровень которого сохраняется, по меньшей мере, на протяжении 8 нед. (заданный общепринятый срок наблюдения) после имплантации. По окончании эксперимента при гистологическом анализе поджелудочной железы крыс-реципиентов с сахарным диабетом были выявлены признаки активной регенерации  $\beta$ -клеток

в островке поджелудочной железы по сравнению с крысами из контрольной группы.

**Заключение.** Полученные результаты функциональной эффективности КИК хрящевой ткани и поджелудочной железы на экспериментальных моделях, ксеногенных относительно клеточной компоненты КИК, можно объяснить стимулирующим действием биомедицинских клеточных продуктов на процессы собственной регенерации поврежденного суставного хряща и поджелудочной железы. Учитывая низкую способность зрелых гепатоцитов к пролиферации, появление большого количества молодых гепатоцитов при имплантации КИК печени на экспериментальной модели хронической печеночной недостаточности в какой-то мере может быть также связано с ее способностью стимулировать собственную регенерацию поврежденной печени. Биостимулирующее действие разработанных КИК на регенерацию поврежденных структур, ско-

рее всего, обусловлено интенсификацией процессов миграции стволовых клеток из окружающих тканей в зону поражения с последующей их дифференцировкой.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов 13-04-12017 офи\_м и в части разработки инъекционных форм клеточно-инженерных конструкций, при финансовой поддержке Минобрнауки в рамках Соглашения № 14.610.21.0001 в части разработки экспериментальных моделей, при финансовой поддержке РФФИ в рамках гранта № 14-25-00055 в части проведения гистоморфологического анализа.*

*Исследование частично профинансировано грантом Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных исследований НИИ-6294.2014.7.*