

ПРИМЕНЕНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ПЛАСТОВ КЛЕТОК ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

К.В. Дергилев, П.И. Макаревич, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфёнова

Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ, Москва, Россия

Application of tissue engineered constructs on the basis of cell sheets for restoration of tissues and organs

K.V. Dergilev, P.I. Makarevich, M.Yu. Menshikov, E.V. Parfyonova

Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

Технология трансплантации клеток в виде сформированных *in vitro* клеточных пластов и ее совершенствование в направлении получения васкуляризированных конструкций, состоящих из нескольких типов клеток, позволяет получить биоинженерный эквивалент ткани, который обеспечивает более высокую выживаемость и интеграцию клеток после трансплантации по сравнению с широко используемым способом трансплантации клеток в виде суспензии, вводимой инъекционно в ткани или кровотоки. Тканеинженерные конструкции на основе клеточных пластов могут успешно замещать утраченную или поврежденную ткань (в том числе и эндокринную), восстанавливая ее функцию. Данная технология на основе аутогенных клеток уже применяется в клинических исследованиях для репарации роговицы, хряща, связок периодонта, слизистой пищевода и показала достаточно высокую эффективность в доклинических исследованиях для восстановления миокарда, печени, поджелудочной и щитовидной желез. Генетическая модификация клеток, из которых затем формируют клеточные пласты, дает возможность использовать эту технологию и для лечения наследственных заболеваний, связанных с недостаточной продукцией секретируемых белков, например, ферментов. В обзоре обсуждаются результаты применения технологии клеточных пластов для восстановления различных тканей и органов и перспективы ее развития для регенеративной медицины.

Ключевые слова: тканеинженерные конструкции, регенерация, клеточный пласт.

Введение

Основными подходами регенеративной медицины являются клеточная терапия и тканевая инженерия, которые активно развиваются в течение последних десятилетий и уже заняли определенную нишу в клинике, продолжая оставаться одними из наиболее актуальных областей исследований.

В основе клеточной терапии лежит стимуляция репаративных процессов за счет регенеративного потенциала клеток (в основном стволовых или прогениторных), которые присутствуют во многих тканях и органах и участвуют в обновлении пула специализированных клеток, имеющих ограниченный срок жизни. Стволовые/прогениторные клетки могут быть выделены из тканей взрослого организма и после этапа культивирования подвергнуты модификации генными конструкциями, снабжены белковыми или иными химическими компонентами для повышения регенеративного потенциала. Полученный клеточный препарат трансплантируется в пораженную ткань либо донора (аутологичная

Cell sheet technology has certain advantages over conventionally used injections as far as it facilitates cell survival and integration after delivery of cells to intended organ/tissue. It also allows to successfully replace lost or irreversibly damaged tissues with restoration of its functions including endo/paracrine activity. Application of cell sheets has gone beyond bench work and now is under clinical translation where it is successfully used for repair of cornea, cartilage, periodontal tissue, esophageal mucosa, pancreas and thyroid gland. Further advances of cell sheet technologies allow to construct pre-vascularized tissue grafts which effects are not limited to tissue repair, but also allows to restore its function via paracrine action of transplanted cells and to ensure long-lasting therapeutic effects. Genetic modification of cells used for cell sheet construction allows to utilize this technology to treat hereditary disorders, deficit of enzymes or other secreted proteins. This review focuses on recent results of therapeutic implication of cell sheets and prospects of this field which gained much attention in regenerative medicine.

Keywords: tissue-engineered constructions, regeneration, cell sheet.

трансплантация), либо стороннему реципиенту (аллогенная трансплантация).

В клинических исследованиях эффективность клеточной терапии не всегда была достаточно высокой, что заставило обратиться к ряду методологических аспектов предложенных технологий. В частности, вопросы вызывал способ доставки клеточного материала, который чаще всего представлял собой инъекционное локальное или системное введение суспензии. Было показано, что доставка клеток в виде суспензии приводит к гибели значительного их числа (по ряду данных, — до 90%) за счет механической травматизации при введении через иглу и индукции их апоптоза, так как клетки после снятия с культуральной посуды находятся в состоянии аноиксиса [1].

Тканевая инженерия занимается конструированием и выращиванием *ex vivo* (и в ряде случаев *in vivo*) тканевых эквивалентов, состоящих из собственных или донорских клеток и биосовместимого материала различного происхождения, комбинация которых воспроизводит трехмерную архитектуру ткани. За-

дачи такого рода решают и с использованием стволовых/прогениторных клеток различного происхождения, что позволяет существенно расширить область применения и спектр полученных тканевых эквивалентов. Однако методы тканевой инженерии, зачастую, требуют применения биореакторов или специальных, технологически сложных культуральных условий, воспроизвести которые «поточно» для широкого применения в клинике затруднительно и дорого. Кроме того, для создания тканеинженерных конструкций часто применяют ксеногенные или синтетические матриксы, способные вызвать иммунный ответ, что может снижать эффективность трансплантации.

Возможной альтернативой существующих подходов может стать трансплантация клеток в виде уже сформированных минимальных тканеинженерных конструкций, состоящих из пластов клеток (англ. cell sheets) – своеобразных «клеточных накладок», представляющих собой одно- или многослойные структуры из одного или нескольких видов клеток в комплексе с наработанным ими же внеклеточным матриксом.

Показано, что трансплантация стволовых/прогениторных клеток в виде клеточных пластов имеет существенные преимущества перед прямым введением клеток в ткань или в питающие ее сосуды в виде суспензии инъекционно [1]. Такой способ трансплантации снимает ограничения, связанные с объемом инъекции, что позволяет проводить доставку большего количества клеток в ту область ткани, где необходима стимуляция репаративных процессов. Трансплантация клеток в виде пластов позволяет сохранить клеточные рецепторы, что обеспечивает более эффективную адгезию к элементам поврежденной ткани. Кроме того, метод клеточных пластов дает возможность создавать многослойные конструкции, обладающие определенной архитектурой, с организованными межклеточными взаимодействиями, что способствует лучшей выживаемости клеток и интеграции в ткань-мишень (рис.). Данный обзор посвящен описанию основных подходов к получению и использованию в регенеративной медицине тканеинженерных конструкций, состоящих из пластов различных клеток.

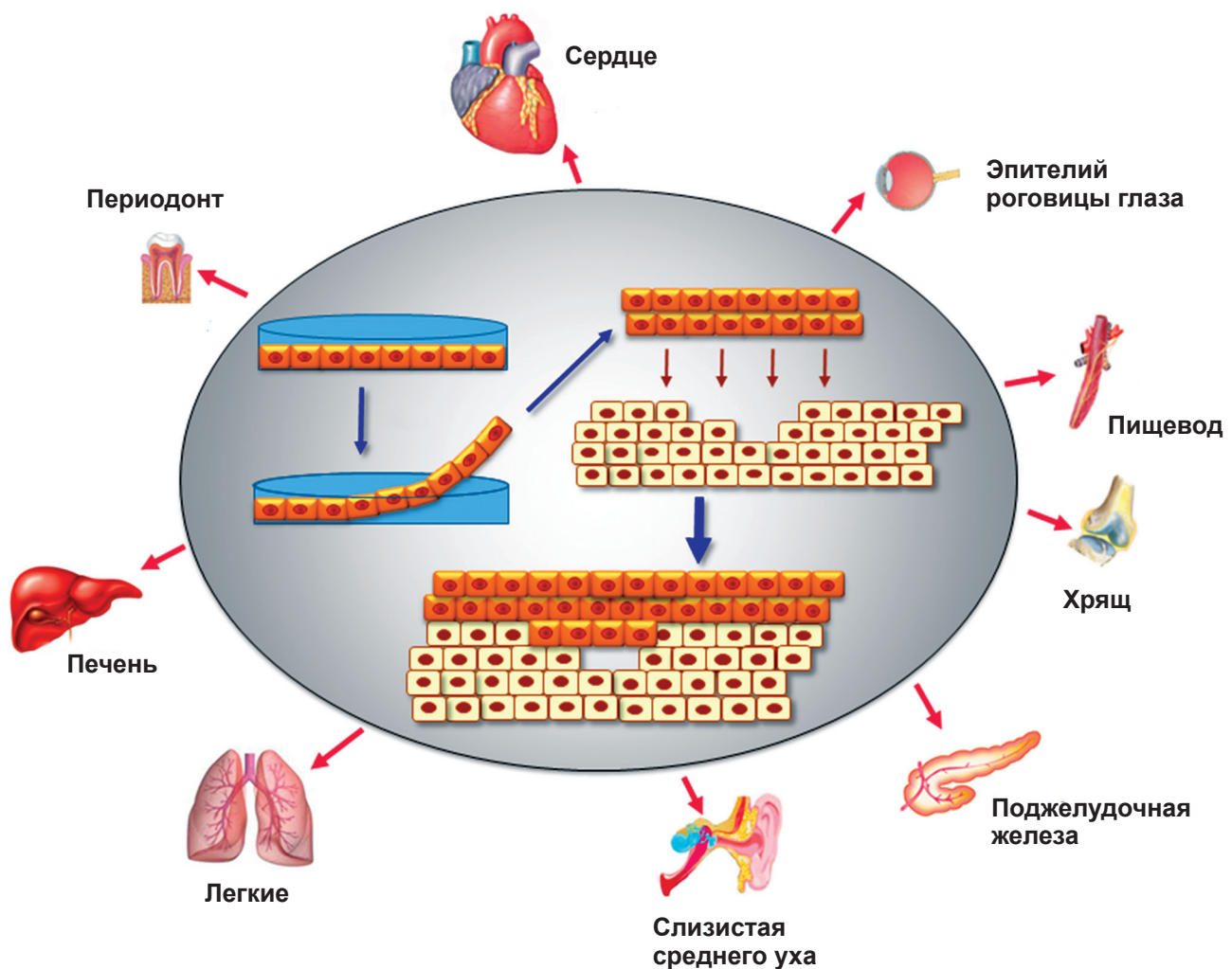


Рис. Применение тканеинженерных конструкций на основе пластов клеток для регенерации тканей и органов

Способы получения клеточных пластов

Первым шагом на пути создания тканеинженерных конструкций из пластов клеток является их культивирование в состоянии повышенной плотности — «конфлюэнта», при котором усиливается формирование межклеточных контактов, включая щелевые контакты, и увеличивается контакт-опосредованный обмен сигналами и гомокринными факторами. После достижения конфлюэнтности клетки вступают в состояние контактного ингибирования, часть из них перестает делиться и начинает продуцировать большое количество белков внеклеточного матрикса, которые определяют как механические, так и функциональные свойства клеточных пластов. Интересно отметить, что клетки, например, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга, при длительном (5 недель) культивировании в таком гиперконфлюэнтном состоянии сохраняют жизнеспособность, низкодифференцированное состояние, способность к дифференцировке в остео-, хондро- и адипогенном направлениях, метаболическую активность и продолжают продуцировать белки внеклеточного матрикса [2].

Успешное формирование клеточных пластов может быть достигнуто двумя способами — длительным (от 3 до 7 сут.) культивированием в «гиперконфлюэнтном состоянии» [3], при котором важнейшим звеном становится наработка большого объема матрикса, или быстрым (в течение 24–48 ч.) культивированием с высадкой клеток в крайне высокой плотности (до $200\text{--}300 \times 10^3$ кл/см²) [4], при которой ключевую роль играют адгезионные свойства и размер клеток. Следует отметить, что в зависимости от вида клеток используют культуральный пластик с покрытием или без него (табл.) [5].

Вторым важным шагом при создании тканеинженерных конструкций из пластов клеток является открепление полученной конструкции от поверхности культуральной посуды. На этом этапе должно быть обеспечено минимальное воздействие на межклеточные контакты и белки внеклеточного матрикса для сохранения клетками их свойств. Существует несколько подходов для решения этой задачи, которые кратко суммированы в таблице.

Наиболее широко используется для открепления клеточных пластов от поверхности обработка растворами протеолитических ферментов (диспазой, ACCUTASE™, коллагеназой, трипсином), но с применением в десятки раз меньших концентраций фермента и времени экспозиции, чем при пассировании клеточной культуры (до 5–20 сек.), что позволяет предотвратить разрушение межклеточных контактов

и внеклеточного матрикса. Этот метод хорошо зарекомендовал себя для снятия пластов из эпидермиса, корнеального эпителия, эпителия слизистой оболочки полости рта, представляющих типы клеток с хорошо выраженными межклеточными контактами и выполняющих барьерные функции, но он применим и к другим видам клеток [3]. В нашей лаборатории кратковременную ферментативную обработку используют для открепления пластов ММСК и прогениторных клеток сердца животных и человека при создании тканеинженерных конструкций [4, 14, 15]. В другом исследовании клетки культивировали на коллагеновой подложке и снимали клеточный пласт путем ее ферментативной деградации [2].

В литературе описаны подходы к получению клеточных пластов без этапа ферментативной обработки тканеинженерной конструкции. Н. Akiyama с соавт. (2010) предложил применять магнитные катионоактивные липосомы с наночастицами магнетита [16]. Липосомы проникают в клетки путем эндоцитоза или слияния с клеточной мембраной, насыщая цитоплазму магнетитом. В результате культивирования таких клеток на гипoadгезионной посуде в магнитном поле были получены 5–10-слойные конструкции, открепление которых происходило при удалении чашек из магнитного поля. Ограничением данного метода является цитотоксичность наночастиц из-за их взаимодействия с белками цитоплазмы.

Для формирования клеточных пластов используют также культивирование клеток на чашках, покрытых тонким слоем полимеризованного биоразлагаемого фибрина [17]. Такой способ применили для создания конструкций из пластов неонатальных кардиомиоцитов крысы, которые по мере культивирования секретировали протеазы, разрушающие фибрин, что и позволяло легко снимать готовые конструкции с помощью резинового скребка. Клетки в составе конструкций дифференцировались в зрелые сокращающиеся кардиомиоциты, а наложение друг на друга нескольких клеточных пластов приводило к образованию правильно сформированного синцития, который сокращался как *in vitro*, так и *in vivo* после имплантации подкожно. Покрытые фибрином чашки также использовали для получения клеточных пластов и из клеток других типов — ММСК, эндотелиальных прогениторных клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), и скелетных миобластов [18, 19].

Однако наиболее распространенным методом получения конструкций из клеточных пластов является культивирование клеток на чашках с термочувствительным покрытием [8, 20–22]. Несомненное его достоинство в том, что он не требует ферментативной

Таблица. Основные подходы для получения тканеинженерных конструкций из пластов клеток

Условия формирования/открепления клеточного пласта	Ссылка
Ферментативная обработка	[2, 3]
Использование термочувствительного покрытия (PIPAAm и другие)	[6] [7, 8]
Использование магнитных наночастиц и магнитного поля	[9]
Использование покрытия с TiO ₂ и иммобилизованным Arg-Gly-Asp (RGD) пептидом	[10]
Изменение pH среды культивирования	[11]
Использование полиэлектролитного покрытия	[12]
Использование светочувствительного покрытия	[13]

обработки или экзогенного матрикса. С его помощью были получены пласты как эпителиальных, так и не эпителиальных клеток, в том числе из стволовых клеток (ММСК, ИПСК, ЭСК) и их дифференцированных потомков: миоцитов (скелетных, сердечных), гепатоцитов, β -клеток островков Лангерганса и т.д. Принцип метода заключается в том, что культура ведется на чашках, дно которых покрыто термочувствительным полимером — поли-N-изопропилакриламидом (polyNIPAM), который при температуре 37°C является гидрофобным и не препятствует адгезии и росту клеток. При понижении температуры ниже 32°C polyNIPAM становится гидрофильным и, связывая молекулы воды, «набухает», вызывая быстрое открепление клеточного пласта от поверхности под действием минимальных механических усилий.

Таким образом, в настоящий момент в руках исследователей имеется достаточный арсенал методов получения и снятия клеточных пластов. Однако каждый из методов, имея свои достоинства и недостатки, не является универсальным, и для некоторых типов клеток условия приходится модифицировать. В частности, в нашей практике, при переходе от ММСК жировой ткани мыши к ММСК человека мы вынуждены были вновь подбирать оптимальную плотность посева клеток для быстрого получения клеточных пластов. Это было вызвано тем, что размеры ММСК человека в несколько раз больше, чем у мелкого грызуна, что потребовало модификации протокола с учетом новых условий (неопубликованные данные).

Трансплантация клеток в виде конструкций из клеточных пластов для лечения заболеваний сердца

Трансплантация стволовых/прогениторных клеток путем внутривенных или внутримиекардиальных инъекций показала хороший уровень безопасности, но весьма умеренную эффективность в клинических исследованиях у больных с различными заболеваниями сердца [23]. Одной из причин недостаточной эффективности клеточной терапии кардиологических больных является гибель большей части внутримиекардиально введенных клеток в первые сутки после трансплантации [1] и аккумуляция незначительной части клеток в миокарде при внутривенном способе введения [24]. Альтернативным подходом к клеточной кардиомиопластике может быть эпикардиальная трансплантация клеток в виде *ex vivo* сформированных клеточных пластов, в которых сохраняется микроокружение, обеспечивающее жизнеспособность и функциональную активность клеток. Для получения тканеинженерных конструкций из пластов клеток для кардиомиопластики использовались различные типы как стволовых/прогениторных клеток, так и дифференцированных клеток миокарда [25–28].

Первые работы в этой области были нацелены на создание сокращающихся «эквивалентов миокарда» из эмбриональных или неонатальных кардиомиоцитов [22, 29]. Было показано, что два клеточных пласта, сформированных из эмбриональных кардиомиоцитов цыпленка, хорошо адгезируют к поверхности миокарда, формируют межклеточные контакты (десмосомы, нексусы), характерные для зрелого миокарда, и способны к спонтанному синхронному сокращению с распространением волны возбуждения по ее поверхности [29]. Эластичность такой кон-

струкции позволила создать эквивалент трубчатого сердца, в котором сила сокращений зависела от степени растяжения стенки, то есть, действовал закон Франка-Старлинга, что говорило о физиологической релевантности использованного подхода [30].

При подкожной трансплантации иммунодефицитным мышам многослойной конструкции из пластов, образованных неонатальными кардиомиоцитами крысы, спонтанные сокращения и васкуляризация трансплантата наблюдались уже с 3 сут. и сохранялись на протяжении всего года, а его размер и сила сокращения увеличивались по мере роста животного-реципиента [31]. Гистологическое исследование трансплантата выявило характерную для ткани сердца структуру из продольно вытянутых кардиомиоцитов с хорошо организованным сократительным аппаратом и выраженными вставочными дисками, что свидетельствовало о хорошей выживаемости кардиомиоцитов и сохранении ими характерных свойств после подкожной трансплантации в виде пластов.

Более того, многослойные клеточные конструкции из неонатальных кардиомиоцитов крысы после эпикардиальной имплантации на миокард интегрировались не только на морфологическом, но и на электромеханическом уровнях, что проявлялось синхронизацией сердца-реципиента и пласта уже в течение часа после имплантации. Данное наблюдение было подтверждено на различных моделях повреждения сердца у экспериментальных животных [32, 33].

Однако трансляция этих исследований в клиническую практику не представлялась возможной, так как основной клеточной составляющей таких «эквивалентов миокарда» были эмбриональные или неонатальные кардиомиоциты. Решением этой проблемы может быть использование аутологических кардиомиоцитов человека, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [34]. С применением термочувствительного пластика из них были сформированы многослойные конструкции из клеточных пластов, способные к спонтанному ритмичному сокращению [35].

Важным аспектом приживления трансплантированных многослойных конструкций является их васкуляризация, поэтому следующим шагом в этой области стало создание комбинированных конструкций, состоящих из кардиомиоцитов (~40%), эндотелиальных (~9%) и стромальных клеток сосудов (~51%) [6, 36]. Эпикардиальная имплантация таких многослойных конструкций значительно лучше восстанавливала систолическую функцию сердца после экспериментального инфаркта по сравнению с конструкциями только из кардиомиоцитов. Причем степень этого восстановления тесно соотносилась с выраженностью васкуляризации как самого клеточного пласта, так и подлежащего миокарда, которая была обусловлена секрецией клетками имплантата ангиогенных факторов роста (VEGF, bFGF и др.) Вероятно, предложенная комбинация клеток создает условия для оптимизации их паракринной проангиогенной активности.

Возможность эффективной стимуляции ангиогенеза при эпикардиальной имплантации конструкций из пластов клеток была продемонстрирована на моделях инфаркта миокарда (ИМ) [37] и дилатационной кардиомиопатии [28], когда в качестве клеток для формирования конструкций использовали ММСК, секретирующие широкий спектр ангиогенных факторов роста [38].

Особое внимание для создания многослойных клеточных пластов для кардиомиопластики привлекают резидентные стволовые/прогениторные клетки сердца (ПКС), которые участвуют как в обновлении пула стареющих клеток сердца на протяжении всей жизни, так и в восстановлении миокарда после повреждения [39–42]. Сочетание способности ПКС к дифференцировке в кардиомиоциты, а также в эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудов с паракринными эффектами этих клеток делает их особенно привлекательным клеточным материалом для получения тканеинженерных конструкций. Эпикардальная имплантация трех пластов из *c-kit*⁺ ПКС человека иммунодефицитным мышам с моделью инфаркта миокарда, значительно увеличивала площадь жизнеспособного миокарда в зоне некроза, стимулировала ангиогенез в периинфарктной зоне, оказывала антифибротическое действие, уменьшала постинфарктное ремоделирование левого желудочка и существенно повышала систолическую функцию сердца, причем эффективность трехслойных конструкций (состоящих из последовательно наложенных друга на друга пластов клеток) значительно превышала эффективность однослойных [26]. Эффективность восстановления функции сердца с помощью эпикардальной имплантации конструкций из пластов ПКС могла быть значительно повышена при одновременном введении в миокард суспензии эндотелиальных прогениторных клеток, что стимулировало миграцию *c-kit*⁺ ПКС из имплантата в поврежденный миокард, усиливало неоваскуляризацию и уменьшало развитие фиброзной ткани [7]. Хорошая интеграция в миокард была продемонстрирована и для имплантатов из пластов гетерогенной популяции *Sca-1*⁺ прогениторных клеток сердца, часть клеток которой дифференцировалась в зрелые кардиомиоциты [43]. За счет секреции широкого набора факторов роста и цитокинов, а также растворимой формы молекулы адгезии *sVCAM-1*, имплантаты из этих клеток предотвращали гибель кардиомиоцитов в зоне повреждения через активацию сигнального пути *sVCAM-1/VLA4* [43].

Учитывая важную роль паракринной активности клеток имплантата в оказываемых ими регенеративных эффектах [44], значительные усилия были направлены на разработку конструкций из клеточных пластов, основанных на комбинациях ПКС и различных типов ММСК, которые благодаря уникальной паракринной активности, включающей в том числе и секрецию внеклеточных везикул-экзосом, обеспечивали оптимальную выживаемость, васкуляризацию и интеграцию эпикардального имплантата в миокард [45, 46]. С этой же целью для создания сердечных имплантатов использовали комбинацию ММСК жировой ткани и скелетных миобластов, которые сохраняют жизнеспособность даже при тяжелой гипоксии благодаря секреции проангиогенных и антиапоптотических факторов [47]. Добавление ММСК жировой ткани к скелетным миобластам еще более увеличивало их секреторную активность и в целом секреторную активность всего имплантата, который продуцировал большие количества HGF, VEGF и лептина и оказывал более выраженное проангиогенное, антифибротическое действие, лучше предотвращал постинфарктное ремоделирование левого желудочка, чем конструкции из одного типа клеток [47]. Положительное действие ММСК в составе кардиальных клеточных имплантатов обусловлено не только их

способностью секретировать проангиогенные и антиапоптотические молекулы, но и их хорошо известными иммуномодулирующими свойствами, которые могут противодействовать воспалительным реакциям и иммунным процессам, играющим важную роль в развитии повреждения миокарда при инфаркте и последующем ремоделировании левого желудочка [48].

Именно из-за паракринных эффектов для получения конструкций из клеточных пластов используют зрелые адипоциты, способные секретировать адипокины и, прежде всего, адипонектин, обладающий кардиопротективными, противовоспалительными, антифибротическими и антигипертрофическими свойствами [49, 50]. Эпикардальная имплантация конструкций из пластов адипоцитов, полученных путем дифференцировки стромально-васкулярной фракции клеток жировой ткани мыши, на модели инфаркта уменьшала инфильтрацию макрофагами зоны повреждения миокарда и снижала содержание в ней провоспалительных цитокинов (GM-CSF, IL-6, G-CSF и MCP-1) [51]. Эти эффекты могли быть связаны с секрецией клетками имплантата как адипонектина, так и HGF, которые обладают взаимодополняющими противовоспалительными и кардиопротективными эффектами.

Противовоспалительные свойства имплантатов из адипоцитов были также продемонстрированы на модели миокардита у свиньи [8]. После эпикардальной имплантации такой конструкции в области левого желудочка было отмечено уменьшение лейкоцитарной инфильтрации подлежащего миокарда, пролиферации CD4⁺ Т-клеток и макрофагов и увеличение количества иммуносупрессивных Foxp3⁺ регуляторных Т-лимфоцитов наряду с восстановлением сократительной способности миокарда, уменьшением гипертрофии сохранившихся кардиомиоцитов и процента фиброзной ткани. Особенно важно, что имплантат из адипоцитов обладал антиаритмическим эффектом.

Таким образом, сегодня имеется достаточно большой опыт доклинической апробации тканеинженерных конструкций из клеточных пластов для лечения заболеваний сердца, который показывает рациональность использования комбинированных конструкций их пластов клеток различных типов, обеспечивающих плейотропные эффекты как за счет паракринных влияний клеток (ангиогенный, противовоспалительный), так и за счет их способности к дифференцировке и структурной интеграции (замещению ткани). Относительная простота получения таких конструкций и их эпикардальной имплантации создает хорошие перспективы для перехода к клиническим исследованиям этой технологии.

Конструкции из клеточных пластов для лечения сахарного диабета

Причиной сахарного диабета 1 типа (СД 1 типа) является гибель β-клеток островков Лангерганса, вырабатывающих инсулин, которые, в отличие от клеток, вырабатывающих пищеварительные ферменты, практически не способны к восстановлению. Заместительная инсулинотерапия способна замедлить, но не остановить прогрессирование заболевания и развитие поздних осложнений, поэтому альтернативным подходом для лечения СД 1 типа может стать трансплантация аутологических или

аллогенных стволовых/прогениторных клеток для стимуляции регенерации пула β -клеток или восполнения их количества. Определенные перспективы связывают с использованием тканеинженерных конструкций из клеточных пластов для создания тканевого эквивалента поджелудочной железы. С целью сохранения жизнеспособности такого имплантата предложены варианты его размещения в местах, где исключается прямой контакт с кровью (почечная капсула, брюшная полость, сальниковая сумка, подкожная прострaнство), что предотвращает развитие иммунного ответа на трансплантированные клетки аллогенного материала. Проблемой при получении пластов из клеток островков Лангерганса является их низкая адгезивность к термочувствительному полимеру, поэтому для них применяют комбинированное покрытие из polyNIPAM и ламинина-5, который, взаимодействуя с $\alpha\beta 1$ - и $\alpha 3\beta 1$ -интегринами, способен усиливать клеточную адгезию и увеличивать выживаемость и секреторную активность клеток поджелудочной железы [52, 53]. При подкожной трансплантации полученных конструкций мышам со стрептозотоцин-индуцированным диабетом было достигнуто поддержание нормогликемии на протяжении более чем 100 дней [53]. При этом в ткани трансплантата соотношение α - и β -клеток сохранялось постоянным, но наблюдалось четкое разграничение их локализации: α -клетки были сосредоточены по периферии, а ядро трансплантата было образовано β -клетками, что совпадает с гистологическим строением поджелудочной железы и связано с особенностями кровоснабжения и паракриной регуляции функции этих типов клеток [54, 55]. Помимо использования строго определенных мест при трансплантации конструкций из пластов клеток поджелудочной железы, для повышения их выживаемости применяют ко-трансплантацию с клетками Сертоли [56], выстилающими семенные каналцы млекопитающих и обеспечивающими иммунопротекцию и нормальное развитие сперматогенных клеток. Ко-трансплантации клеток Сертоли и ксенотрансплантата из пластов неонатальных клеток поджелудочной железы свиньи под кожу передней брюшной стенки человека позволила поддерживать продукцию инсулина на протяжении 4 лет, чему способствовала иммунопротекция пересаженных клеток поджелудочной железы клетками Сертоли [56]. Похожие результаты были получены и при использовании комбинированной конструкции из клеток Сертоли, поджелудочной железы и эндотелия [57]. Другой подход, позволяющий избежать ксенотрансплантации, основан на применении β -клеток поджелудочной железы, полученных из эмбриональных стволовых клеток. Используя линию СуТ49 ЭСК и четырехступенчатый протокол дифференцировки, американские исследователи получили гетерогенную популяцию эндодермальных клеток-предшественников и панкреатических эндокриноцитов, которые были чувствительны к уровню глюкозы, продуцировали инсулин, глюкагон и экспрессировали тканеспецифические маркеры CNGA, NKX6-1 и PDX1 [58]. Конструкцию из пластов этих клеток имплантировали в жировую ткань придатка яичка иммунодефицитной мыши с сахарным диабетом, индуцированным стрептозотоцином. Трансплантированные клетки сохраняли жизнеспособность на протяжении 4–6 мес. и продуцировали инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы в крови. Однако, несмотря на способность к неограниченной

пролиферации, возможность криоконсервации ЭСК и отработанные протоколы дифференцировки ЭСК в клетки поджелудочной железы, этические проблемы, связанные с получением ЭСК человека, ограничивают клиническое применение полученных из них клеточных продуктов.

Конструкции из клеточных пластов для восстановления функции печени

Печень человека обладает чрезвычайно высоким регенеративным потенциалом, однако его оказывается недостаточно, чтобы компенсировать потерю ее функции при массивной хирургической резекции и заболеваниях, приводящих к циррозу. Кроме того, существует целый ряд наследственных метаболических нарушений (болезнь Криглера – Наяра, дефицит орнитинтранскарбамилазы, болезнь Гирке и др.), приводящих к необратимому поражению печени. Единственным способом лечения таких больных является ортотопическая трансплантация печени, однако дефицит донорского материала ограничивает ее широкое применение, делая актуальной разработку тканеинженерных подходов для замещения утраченной ткани печени. В этой области определенный интерес представляют и конструкции на основе клеточных пластов.

Существенной проблемой при трансплантации конструкций из гепатоцитов является высокая чувствительность этих клеток к недостатку кислорода, в связи с чем их выживаемость определяется формированием сосудистой сети около трансплантата. Учитывая это, для тестирования на моделях повреждения печени у экспериментальных животных, были созданы многослойные клеточные пласты, представляющие собой слой гепатоцитов крысы, заключенный между двумя слоями эндотелиоцитов, выделенных из сонной артерии коровы. В таком окружении гепатоциты до 28 сут. сохраняли функциональную активность (секрецию альбумина и синтез мочевины), нормальную форму митохондрий, экспрессировали специфические маркеры (цитохромы, глюкозо-6-фосфатазу и пр.), а также формировали внутреннюю сеть, похожую на билиарные каналцы [59, 60].

Для обеспечения выживаемости и васкуляризации трансплантата до момента операции, предлагается культивировать пласты гепатоцитов в пространстве под кожей, предварительно васкуляризованном с помощью введения bFGF. Этот подход позволяет добиться сохранения жизнеспособности гепатоцитов и их нормального функционирования в течение почти восьми мес. [61].

Регенерация тканей глаза с помощью конструкций из клеточных пластов

Длительные воспалительные заболевания и повреждения глаз вызывают снижение количества активных стволовых клеток, нарушение регенеративных процессов и неминуемо приводят к снижению остроты зрения и слепоте. Для лечения этих патологий активно используется реконструктивная хирургия, но дефицит донорской ткани глаза и высокая частота отторжения аллогенных трансплантатов ограничивает ее применение, в связи с чем внимание было обращено на клеточную терапию и в частности, на применение технологии клеточных

пластов. Одной из первых работ в данной области было исследование японских ученых [62], которое описывало подход к восстановлению роговицы на основе пластов из эпителиоцитов слизистой полости рта, полученных от пациентов с двухсторонней тотальной недостаточностью лимбальных стволовых клеток. Клетки культивировали в течение 2 нед. на фидерном слое из фибробластов и получали пласты клеток, которые имплантировали на переднюю поверхность роговицы бесшовным способом. Имплантат быстро адгезировал, образуя равномерную гладкую поверхность, далее отмечалась реэпителизация поверхности роговицы, восстановление барьерной функции и зрения, а сама конструкция сохраняла прозрачность на протяжении не менее 14 мес. [63].

Аналогичное клиническое исследование, выполненное на 25 пациентах с язвенными дефектами роговицы [64], показало эффективное закрытие язвенных дефектов и уменьшение выраженности кератопатии, а также отсутствие осложнений в течение года после трансплантации конструкций из пластов аутологичных эпителиоцитов слизистой полости рта.

Технология клеточных пластов была апробирована и для создания конструкций из клеток пигментного эпителия сетчатки. Для повышения стабильности сформированных пластов в среду культивирования добавляли TGF- β или PDGF, что приводило к формированию большего числа межклеточных контактов и повышению продукции белков внеклеточного матрикса [65].

При пересадке таких конструктов в подсетчаточное пространство трансплантированные клетки хорошо интегрировались в подлежащую ткань и образовывали межклеточные контакты с клетками пигментного эпителия реципиента. Кроме того, выживаемость и функциональная интеграция клеточных пластов была выше, чем при введении клеточной суспензии [66].

Пластика слизистой пищевода с помощью клеточных пластов

Стенозы пищевода после проведения гастроэктомии, проксимальных резекций желудка представляют собой серьезные осложнения, которые отражаются на качестве жизни пациентов и зачастую требуют бужирования, баллонной дилатации, установки временного стента и пр. Актуальными и малоизученными остаются проблемы профилактики рубцовых стенозов, в частности восстановление слизистой оболочки пищевода, которое способствует уменьшению воспалительных и атрофических процессов. В последние годы для этих целей используется малоинвазивный метод восстановления пищевода, основанный на технологии клеточных пластов. В экспериментах на собаках [67] было показано, что конструкции, полученные из пластов аутологичных эпителиоцитов слизистой полости рта, могут с успехом быть применены для закрытия дефектов слизистой пищевода в ходе эндоскопической манипуляции и препятствовать в дальнейшем образованию стеноза. Данный метод лечения успешно прошел клинические исследования у пациентов с частичной резекцией пищевода [68, 69]. Закрытие язвенных дефектов наблюдалось спустя 3,5 нед. после трансплантации клеточной накладки. При этом проведение манипуляции не вызывало развития побочных эффектов, включая дисфагию, возникновение стриктур и др.

Восстановление ткани щитовидной железы

Одним из самых распространенных заболеваний щитовидной железы у лиц пожилого и старческого возраста является гипотиреоз. Причинами его возникновения могут быть воспалительные процессы щитовидной железы различной природы (например, аутоиммунный тиреоидит), дефицит йода в пище (эндемический зоб), травмы щитовидной железы, заболевания гипофиза (вторичный гипотиреоз) и т.д. Основа лечения гипотиреоза у лиц пожилого и старческого возраста – подбор адекватной дозы тиреоидных гормонов, необходимой для компенсации нарушений метаболизма. Однако такой метод лечения не приводит к выздоровлению, а лишь обеспечивает функциональную компенсацию щитовидной железы. В 2009 г. японскими исследователями предложен метод восстановления ткани щитовидной железы путем использования конструкций из клеточных пластов, образованных клетками щитовидной железы, культивированных на чашках с термочувствительным полимером [70]. После тотальной резекции щитовидной железы у крысы подкожная трансплантация таких конструкций вызывала нормализацию уровня гормонов Т3 и Т4 в крови уже через неделю. Гистологические исследования подтвердили формирование здоровой ткани поджелудочной железы в зоне трансплантации. Таким образом, трансплантация клеток щитовидной железы в виде клеточных пластов способствовала формированию *in vivo* гистологически и функционально полноценной щитовидной железы, которая была способна продуцировать гормоны Т3 и Т4 на протяжении 4 недель.

Восстановление суставов с использованием технологии клеточных пластов

Из-за плохого кровоснабжения и низкой плотности клеток суставные хрящи очень плохо регенерируют, поэтому при их повреждении крайне редко наблюдается спонтанное заживление. Трансплантация хондроцитов является одним из наиболее развитых направлений клеточной терапии и тканевой инженерии, доказавшей свою эффективность в сравнении с другими хирургическими методами. Именно в этой области наиболее успешно разрабатывается технология трансплантации в виде клеточных пластов. Серия работ по этой технологии была выполнена японскими исследователями, показавшими восстановление поверхностных повреждений суставного хряща у кролика с помощью трансплантации пласта из хондроцитов, приготовленного на термочувствительных культуральных чашках [71]. Эта технология была успешно применена и для репарации глубоких дефектов хрящевой поверхности коленных суставов у карликовых домашних свиней. Было показано, что культивируемые в виде клеточных пластов хондроциты не обладают туморогенностью и при трансплантации в коленный сустав не попадают в другие ткани [72, 73], и в 2013 г. были начаты клинические исследования, доказавшие безопасность и эффективность данной технологии [74]. Технология клеточных пластов была недавно использована для создания тканеинженерного хряща методом «сэндвича» [75]. Для этого были получены лиофилизированные слои децеллюляризованного ушного хряща свиньи, на которые наслаивали слои из хондроцитов новорожденных поросят. «Сэндвич» из 20 слоев культивировали

4 нед. и затем имплантировали под кожу иммунодефицитной мыши. Через 12 нед. после имплантации формировался зрелый хрящ, что было подтверждено окраской сафронином O, толуидиновым синим и антителами к коллагену II типа.

*Лечение наследственных энзимопатий
с помощью технологии клеточных пластов*

Для лечения наследственных энзимопатий может быть использована трансплантация генетически модифицированных клеток, продуцирующих недостающий энзим. В этом плане разработка методов трансплантации клеток, обеспечивающих их максимальное выживание и секреторную активность, является крайне актуальной. Таким методом может быть трансплантация клеточных пластов. Этот метод использовался для разработки технологии клеточной терапии гемофилии А — наследственного заболевания, сцепленного с X-хромосомой, для которого характерна недостаточность или отсутствие в плазме фактора свертываемости крови VIII, продуцируемого печенью. Для решения этой проблемы на модели гемофилии у мыши была проведена оценка эффективности подкожной трансплантации пластов из генетически модифицированных эндотелиальных прогениторных клеток, продуцирующих фактор VIII [76]. Была продемонстрирована хорошая выживаемость трансплантата, поддерживающего эффективную секрецию фактора VIII с восстановлением его уровня в крови и уменьшением времени кровотечения у животных.

Заключение

Технология трансплантации клеток в виде конструкций из сформированных *in vitro* клеточных пластов может использоваться в различных областях регенеративной медицины. Она обеспечивает высокую выживаемость клеток после трансплантации за счет сохранения межклеточных взаимодействий и связи с матриксом, синтезированным клетками пласта, что способствует успешной интеграции и замещению утраченной или поврежденной ткани с восстановлением ее функции. Такие простые конструк-

ции из пласта клеток одного вида могут успешно использоваться для лечения повреждений роговицы. Совершенствование этой технологии в направлении получения васкуляризованных конструкций, сформированных из нескольких видов клеток, включая специализированные клетки, ММСК и клетки сосудов, а также синтезированного этими клетками матрикса, позволяет получить биоинженерный эквивалент ткани для замещения, превышающий по толщине перфузионный барьер (100–150 мкм), что важно для замещения ткани при повреждении сердца, печени, поджелудочной железы и т.д. Кроме того, подобный эквивалент может служить моделью для тестирования лекарственных препаратов или оценки межклеточных взаимодействий. Генетическая модификация клеток, из которых затем формируют клеточные пласты, позволяет адаптировать эту технологию для лечения наследственных заболеваний, вызываемых недостаточной продукцией белков (например, энзимопатий), или для локального ускорения регенерации путем повышения продукции клетками факторов, стимулирующих рост сосудов, нервов и пролиферацию клеток. Применение аутогенных (в том числе полученных из индуцированных плюрипотентных) клеток для формирования таких конструкций имеет существенные преимущества, обусловленные отсутствием опасности иммунного конфликта. Однако получение такого индивидуального продукта достаточно дорого и исключает масштабное производство, что ограничивает его использование в регенеративной медицине. В связи с этим особое внимание привлекает возможность применения аллогенных клеток, в том числе и специально модифицированных для исключения иммунного конфликта. Это позволило бы производить нужные конструкции из клеточных пластов в промышленном масштабе, что значительно бы удешевило их и ускорило внедрение этой технологии в клиническую практику.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-00181.

ЛИТЕРАТУРА

- Hamdi H., Furuta A., Bellamy V. et al. Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann. Thorac. Surg.* 2009; 87(4): 1196-203.
- Nagai N., Yunoki S., Satoh Y. et al. A method of cell-sheet preparation using collagenase digestion of salmon atelocollagen fibrillar gel. *J. Biosci. Bioeng.* 2004; 98(6): 493-6.
- Yeh T.S., Fang Y.H., Lu C.H. et al. Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction. *Biomaterials* 2014; 35(1): 174-84.
- Makarevich P.I., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I. et al. Delivery of genetically engineered adipose-derived cell sheets for treatment of ischemic disorders — development of application in animal models. In: American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT) 18th Annual Meeting. Proceedings of the 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT); 2015 May 13-16; New Orleans, USA. *Molecular Therapy* 2015; 23 Suppl 1. p. S262
- Alrefai M.T., Murali D., Paul A. et al. Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy. *Stem Cells Cloning* 2015; 8: 81-101.
- Masumoto H., Ikuno T., Takeda M. et al. Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6716.
- Kamata S., Miyagawa S., Fukushima S. et al. Improvement of cardiac stem cell sheet therapy for chronic ischemic injury by adding endothelial progenitor cell transplantation: analysis of layer-specific regional cardiac function. *Cell Transplant.* 2014; 23(10): 1305-19.

- Kamata S., Miyagawa S., Fukushima S. et al. Targeted delivery of adipocytokines into the heart by induced adipocyte cell-sheet transplantation yields immune tolerance and functional recovery in autoimmune-associated myocarditis in Rats. *Circ. J.* 2015; 79(1): 169-79.
- Yamamoto Y., Ito A., Kato M. et al. Preparation of artificial skeletal muscle tissues by amagnetic force-based tissue engineering technique. *J. Biosci. Bioeng.* 2009; 108(6): 538-43.
- Yu M.L., Yu M.F., Zhu L.Q. et al. The Effects of TiO₂ Nanodot Films with RGD Immobilization on Light-Induced Cell Sheet Technology. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 582359.
- Guillaume-Gentil O., Semenov O.V., Zisch A.H. et al. pH-controlled recovery of placenta-derived mesenchymal stem cell sheets. *Biomaterials* 2011; 32(19): 4376-84.
- Zahn R., Thomasson E., Guillaume-Gentil O. et al. Ion-induced cell sheet detachment from standard cell culture surfaces coated with polyelectrolytes. *Biomaterials* 2012; 33(12): 3421-27.
- Nakayama Y., Furumoto A., Kidoaki S. et al. Photocontrol of cell adhesion and proliferation by a photoinduced cationic polymer surface. *Photochem. Photobiol.* 2003; 77(5): 480-86.
- Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Makarevich P.I. et al. Tissue engineering cell sheets based on stem cells for cell cardiomyoplasty. In: international congress «The latest methods of cell technologies in medicine». Proceedings of the international congress «The latest methods of cell technologies in medicine». 2014 Sep 5-6; Novosibirsk, Russia: Poster book 2014; 1. p. 66-7.
- Makarevich P.I., Shevchenko E.K., Efimenko A.Yu. et al. Baculovirus-mediated modification of rodent and human adipose-

- derived stromal cells for cell sheet construction and VEGF165 therapeutic delivery. In: American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT) 18th Annual Meeting. Proceedings of the 17th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT); 2014 May 21-24; Washington, USA: Molecular Therapy 2014; 22 Suppl 1. p. S188.
16. Akiyama H., Ito A., Kawabe Y. et al. Genetically engineered angiogenic cell sheets using magnetic force-based gene delivery and tissue fabrication techniques. *Biomaterials* 2010; 31(6): 1251-9.
17. Itabashi Y., Miyoshi S., Kawaguchi H. et al. A new method for manufacturing cardiac cell sheets using fibrin-coated dishes and its electrophysiological studies by optical mapping. *Artif. Organs* 2005; 29(2): 95-103.
18. Liu J., Hu Q., Wang Z. et al. Autologous stem cell transplantation for myocardial repair. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 12(1): 501-11.
19. Xiong Q., Ye L., Zhang P. et al. Bioenergetic and functional consequences of cellular therapy: activation of endogenous cardiovascular progenitor cells. *Circ. Res.* 2012; 111: 455-68.
20. Kikuchi A., Okuhara M., Karikusa F. et al. Two dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1998; 9: 1331-48.
21. Okano T., Yamada N., Sakai H. et al. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (Nisopropylacrylamide). *J. Biomed. Mater. Res.* 1993; 27: 1243-51.
22. Shimizu T., Yamato M., Isoi Y. et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ. Res.* 2002; 90(3): e40.
23. Fisher S.A., Doree C., Mathur A. et al. Meta-analysis of cell therapy trials for patients with heart failure. *Circ. Res.* 2015; 116(8): 1361-77.
24. Kovacic J.C., Fuster V. Cell therapy for patients with acute myocardial infarction: ACCRUed evidence to date. *Circ. Res.* 2015; 116(8): 1287-90.
25. Komae H., Sekine H., Dobashi I. et al. Three-dimensional functional human myocardial tissues fabricated from induced pluripotent stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015; 18: 521-37.
26. Alshamary S., Fukushima S., Miyagawa S. Impact of cardiac stem cell sheet transplantation on myocardial infarction. *Surg. Today* 2013; 970-6.
27. Uchinaka A., Kawaguchi N., Hamada Y. et al. Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts. *Cardiovasc. Res.* 2013; 99(1): 102-10.
28. Hamdi H., Boitard S.E., Planat-Bernard V. et al. Efficacy of epicardially delivered adipose stroma cell sheets in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 2013; 99(4): 640-7.
29. Shimizu T., Yamato M., Akutsu T. et al. Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 60(1): 110-7.
30. Kubo H., Shimizu T., Yamato M. et al. Creation of myocardial tubes using cardiomyocyte sheets and an in vitro cell sheet wrapping device. *Biomaterials* 2007; 28(24): 3508-16.
31. Shimizu T., Sekine H., Isoi Y. et al. Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue Eng.* 2006; 12(3): 499-507.
32. Furuta A., Miyoshi S., Itabashi Y. et al. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ. Res.* 2006; 98(5): 705-12.
33. Sekine H., Shimizu T., Kosaka S. et al. Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells. *J. Hear. Lung Transplant.* 2006; 25(3): 324-32.
34. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
35. Matsuura K., Wada M., Shimizu T. et al. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 425(2): 321-7.
36. Masumoto H., Matsuo T., Yamamizu K. et al. Pluripotent stem cell-engineered cell sheets reassembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization. *Stem Cells* 2012; 30(6): 1196-205.
37. Ishida O., Hagino I., Nagaya N. et al. Adipose-derived stem cell sheet transplantation therapy in a porcine model of chronic heart failure. *Transl. Res. Transl. Res.* 2015; 165(5): 631-9.
38. Makarevich P., Tsokolaeva Z., Shevelev A. et al. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle. *PLoS One* 2012; 7(6): e38776.
39. Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114(6): 763-76.
40. Dawn B., Bolli R. Cardiac progenitor cells: the revolution continues. *Circ. Res.* 2005; 97(11): 1080-2.
41. Bearzi C., Rota M., Hosoda T. et al. Human cardiac stem cells. *PNAS USA* 2007; 104(35): 14068-73.
42. Anversa P., Leri A. Innate regeneration in the aging heart: Healing from within. *Mayo Clin. Proc.* 2013; 88(8): 871-83.
43. Matsuura K., Honda A., Nagai T. et al. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(8): 2204-17.
44. Narita T., Shintani Y., Ikebe C. et al. The use of scaffold-free cell sheet technique to refine mesenchymal stromal cell-based therapy for heart failure. *Mol. Ther.* 2013; 21(4): 860-7.
45. Bel A., Planat-Bernard V., Saito A. et al. Composite cell sheets: A further step toward safe and effective myocardial regeneration by cardiac progenitors derived from embryonic stem cells. *Circulation* 2010; 122(11): 118-23.
46. Zakharova L., Mastroeni D., Mutlu N. et al. Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function. *Cardiovasc. Res.* 2010; 87(1): 40-9.
47. Shudo Y., Miyagawa S., Ohkura H. et al. Addition of mesenchymal stem cells enhances the therapeutic effects of skeletal myoblast cell-sheet transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Tissue Eng. Part A* 2014; 20(3-4): 728-39.
48. Wu S.M., Zhang W.X., Wang M.H. et al. Proteomic analysis of the immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells in a rat heart transplantation model. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2013; 22(6): 785-94.
49. Tao L., Wang Y., Gao E. et al. Adiponectin: an indispensable molecule in rosiglitazone cardioprotection following myocardial infarction. *Circ. Res.* 2010; 106(2): 409-17.
50. Ghantous C.M., Azrak Z., Hanache S. et al. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. *Int. J. Endocrinol.* 2015; 534320.
51. Imanishi Y., Miyagawa S., Maeda N. et al. Induced adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in a mouse myocardial infarction model: A novel drug delivery system for heart failure. *Circulation* 2011; 124 Suppl 11: 10-7.
52. Hammar E., Parnaud G., Bosco D. et al. Extracellular matrix protects pancreatic β -cells against apoptosis: Role of short- and long-term signaling pathways. *Diabetes* 2004; 53(8): 2034-41.
53. Saito T., Ohashi K., Utoh R. et al. Reversal of Diabetes by the Creation of Neo-Islet Tissues Into a Subcutaneous Site Using Islet Cell Sheets. *Transplantation* 2011; 92(11): 1231-6.
54. Kelly C., McClenaghan N.H., Flatt P.R. Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion. *Islets* 2011; 3(2): 41-7.
55. Jain R., Lammert E. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes. Metab.* 2009; 11 Suppl 4: 159-67.
56. Valdés-González R.A., Dorantes L.M., Garibay G.N. et al. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: A 4-year study. *Eur. J. Endocrinol.* 2005; 153(3): 419-27.
57. Li Y., Xue W., Liu H. et al. Combined strategy of endothelial cells coating, sertoli cells coculture and infusion improves vascularization and rejection protection of islet graft. *PLoS One* 2013; 8(2): e56696.
58. Schulz T.C., Young H.Y., Agulnick A.D. et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* 2012; 7(5): e37004.
59. Kim K., Ohashi K., Utoh R. et al. Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets. *Biomaterials* 2012; 33(5): 1406-13.
60. Kim K., Utoh R., Ohashi K. et al. Fabrication of functional 3D hepatic tissues with polarized hepatocytes by stacking endothelial cell sheets in vitro. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015; 121(5): 800.
61. Ohashi K., Tatsumi K., Tatenoe C. et al. Liver tissue engineering utilizing hepatocytes propagated in mouse livers in vivo. *Cell Transplant.* 2012; 21(2-3): 429-36.
62. Nishida K., Yamato M., Hayashida Y. et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 2004; 77(3): 379-85.
63. Nishida K., Yamato M., Hayashida Y. et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351(12): 1187-96.
64. Burillon C., Huot L., Justin V. et al. Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2012; 53(3): 1325-31.
65. Kubota A., Nishida K., Yamato M. et al. Transplantable retinal pigment epithelial cell sheets for tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(19): 3639-44.
66. Yaji N., Yamato M., Yang J. et al. Transplantation of tissue-engineered cell sheets. *Gastrointest. Endosc.* 2009; 69(5): 253-4.

67. Ohki T., Yamato M., Ota M. et al. Endoscopic transplantation of human oral mucosal epithelial cell sheets—world's first case of oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 2006; 55(12): 1704-10.

68. Ohki T., Yamato M., Ota M. et al. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered retinal pigment epithelial cell sheets in a rabbit model. *Biomaterials* 2009; 30(5): 797-803.

69. Ohki T., Yamato M., Murakami D. et al. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous cell sheets. *Gastroenterology* 2012; 143(3): 582-8.

70. Arauchi A., Shimizu T., Yamato M. et al. Tissue-engineered thyroid cell sheet rescued hypothyroidism in rat models after receiving total thyroidectomy comparing with nontransplantation models. *Tissue Eng. Part A* 2009; 15(12): 3943-9.

71. Kaneshiro N., Sato M., Ishihara M. et al. Cultured articular chondrocytes sheets for partial thickness cartilage defects utilizing

temperature-responsive culture dishes. *Eur. Cell Mater.* 2007; 13: 87-92.

72. Ebihara G., Sato M., Yamato M. et al. Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials* 2012; 33 (15): 3846-51.

73. Yokoyama M., Sato M., Umezawa A. et al. Assessment of the safety of chondrocyte sheet implantation for cartilage regeneration. *Tissue Eng. Part C Methods* 2015; 22(1): 59-68.

74. Sato M., Yamato M., Hamahashi K. et al. Articular cartilage regeneration using cellsheet technology. *Anat. Rec. (Hoboken)* 2014; 297(1): 36-43.

75. Gong Y.Y., Xue J.X., Zhang W.J. et al. A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes. *Biomaterials* 2011; 32(9): 2265-73.

76. Tatsumi K., Sugimoto M., Lillicrap D. et al. A novel cell-sheet technology that achieves durable factor VIII delivery in a mouse model of hemophilia A. *PLoS One* 2013; 8(12): e83280.

Поступила: 01.03.2016