

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Проблема кровоснабжения больших тканеинженерных костных графтов на пути разрешения

До настоящего времени в тканевой инженерии особое место занимает проблема обеспечения адекватного кровоснабжения трансплантированного материала, актуальность которой постоянно возрастает с развитием медицинских технологий. В частности, современный уровень травматологии и ортопедии теоретически позволяет оптимизировать восстановление больших по объёму участков костных органов с помощью тканеинженерных эквивалентов костной ткани. Однако графты больших размеров в условиях *in vivo* испытывают дефицит кровоснабжения: клетки, находящиеся на периферии графта, получают большее количество кислорода и питательных веществ, чем пул центральной части, численность которого быстро снижается. Доказано, что клетки, отдалённые от гемомикроциркуляторного русла более чем на 200–500 мкм, неизбежно погибают в ходе эксперимента [1, 2], а матрикс замещается волокнистой соединительной тканью. В связи с этим во многих исследованиях, в которых используются трансплантаты для замещения дефектов критических размеров, результаты применения носителей с клетками и без них существенно не отличаются.

Чтобы повысить выживаемость клеток, входящих в состав трансплантата, проводятся разработки дополнительных методов индукции ангиогенеза. В частности, используются цитокины – сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и фактор роста фибробластов b (FGF b) – как модуляторы роста сосудов [3, 4]; применяется метод префабрикации, основанный на имплантации носителя в богато кровоснабжаемую ткань (чаще всего – мышечную) для формирования в нём собственной капиллярной сети, которую на этапе основной трансплантации соединяют с кровеносным руслом реципиента [4, 5].

В последнее время всё большее внимание уделяется модели артериовенозной петли (arteriovenous loop), состоящей из артериального и венозного сосудов крупного калибра, искусственно соединённых венозным анастомозом с помощью микрохирургической техники [6, 7, 8]. Шунт играет роль коллатерали, располагать которую можно в зависимости от выбранного места трансплантации. Артериовенозная петля, помещённая в центральную часть трансплантата, является источником «осевой васкуляризации». Подготовка носителя к данной манипуляции предполагает создание сквозного отверстия в его центре и радиального разреза, через который осуществляется проведение венозного анастомоза в центр матрикса. В результате образование новой капиллярной сети происходит изнутри («внутренняя васкуляризация» [1]), что в сочетании с ангиогенезом с периферии («внешняя васкуляризация» [1]) обеспечивает адекватное кровоснабжение и, таким образом, открывает значительные перспективы в решении проблемы повышения выживаемости клеток, входящих в состав графтов.

Для подтверждения значимости модели артериовенозной петли как пути решения проблемы кровоснабжения трансплантатов Andreas Arkudas с соавт. (2007) опубликовали в журнале *Tissue Engineering* результаты научной работы, в которой трансплантировали крысам деминерализованную

бычью губчатую костную ткань (processed bovine cancellous bone, PBCB) [7]. Животным первой группы (n = 34) носитель, имеющий форму диска (9×5 мм), трансплантировали в зону артериовенозной петли, созданной между бедренными артерией и веной, и через 6 недель инъецировали в матрикс 5×10^6 аутогенных остеобластов, меченных флуорохромом (carboxyfluorescein diacetate, CFDA). Животным контрольной группы (n = 32) костный матрикс вводили подкожно и инъецировали те же клетки спустя 6 недель. Полученные материалы были подвергнуты гистологическому, морфометрическому и молекулярно-биологическому анализу через 1, 4, 8, 16 недель для определения доли выживших клеток. Было доказано, что «осевая васкуляризация» в значительной степени увеличивает жизнеспособность клеток, несмотря на одинаково интенсивную воспалительную реакцию, показанную в обеих группах. Формирование костной ткани на всём протяжении матрикса было выявлено лишь в одном случае – в материале, изъятном спустя 16 недель, что связано, возможно, с недостатками методики внесения клеток. В частности, доказано, что для реализации своего регенераторного потенциала клеточная популяция должна находиться в адгезированном к поверхности носителя состоянии [9], чего невозможно достичь при инъекционном введении.

Кроме того, в работе U. Kneser с соавт. (2006) определяли эффективность использования артериовенозной петли как индуктора «внутренней васкуляризации» матрикса без клеток [8]. Исследователи пришли к выводу, что достаточная плотность капилляров в материале из PBCB при использовании модели артериовенозной петли определяется лишь к восьмой неделе. Данный факт, в дополнение к неэффективности выбранного в исследовании 2007 года метода введения клеток, объясняет отсутствие сформированной костной ткани на первой и четвёртой неделях.

Реализация остеогенных потенциалов тканеинженерных эквивалентов костной ткани больших размеров с использованием артериовенозной петли является перспективным и многообещающим методом. Однако на сегодняшний день техника префабрикации не уступает ему по своим результатам. В частности, еще в 1998 году F. Casabona с соавт. опубликовал материалы исследования, в котором матрикс из гидроксиапатита, населённый остеогенными клетками костного мозга, трансплантировали в широчайшую мышцу спины. Спустя восемь недель извлечённый материал по гистологическому строению соответствовал губчатой костной ткани [10]. Успешные результаты работы во многом обусловлены оптимальной адгезией клеток к гидроксиапатиту в условиях *in vitro*.

Таким образом, модель артериовенозной петли является ещё одним звеном в цепи индуцированной репаративной регенерации, потенциально способным оптимизировать кровоснабжение тканеинженерных эквивалентов и тем самым повысить выживаемость вносимых клеточных элементов, что способствует достижению положительных результатов трансплантации. Однако непосредственная методика графтинга с применением модели «осевой васкуляризации» требует дальнейшего изучения и совершенствования.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Folkman J., Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J. Exp. Med.* 1973; 138: 745–53.
2. Polykandriotis E., Arkudas A., Horch R. et al. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science. *J. Cell Mol. Med.* 2007; 11(1): 6–20.
3. Arkudas A., Tjiawi J., Bleiziffer O. et al. Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate Angiogenesis in the AV Loop Model. *Mol. Med.* 2007; 13(9–10): 480–7.
4. Ahrendt G., Chickering D., Ranieri J. Angiogenic growth factors: a review for tissue engineering. *Tissue Eng.* 1998; 2: 117–30.
5. Khouri R., Upton J., Shaw W. Prefabrication of composite free flaps through staged microvascular transfer: an experimental and clinical study. *Plast. Reconstr. Surg.* 1991; 87: 108–15.
6. Lokmic Z., Stillaert F., Morrison W. et al. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB J.* 2007; 21(2): 511–22.
7. Arkudas A., Beier J., Heidner K. et al. Axial prevascularization of porous matrices by an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng.* 2007; 13(7): 1549–60.
8. Kneser U., Polykandriotis E., Ohnolz J. et al. Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue Eng.* 2006; 12: 1721–31.
9. Kuznetsov S.A., Robey P.G. A look at the history of bone marrow stromal cells. *Graft.* 2000; 3(6): 278–83.
10. Casabona F., Martin I., Muraglia A. et al. Prefabricated engineered bone flaps: an experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1998; 101(3): 577–81.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Arkudas A., Beier J., Heidner K. et al. Axial prevascularization of porous matrices by an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng.* 2007; 13(7): 1549–60

HUMAN STUDY

Восстановление слизистой оболочки полости рта путем трансплантации аутогенных кератиноцитов: клиническое исследование

Комплекс заболеваний слизистой оболочки полости рта иногда требует применения активной хирургической тактики. Состояния после резекции лейкоплакии, плоскоклеточного рака, а также атрофии слизистой оболочки альвеолярного гребня, сопровождающиеся потерей или поражением ее участка на площади более 1 см², требуют восстановления дефекта. В настоящее время хирургическая тактика сводится к перемещению свободных лоскутов. Однако не всегда операция может быть успешна. Это случается либо в связи с развитием осложнений (некроз трансплантата), или когда дефект не позволяет выполнить оперативное вмешательство, не нанеся ущерб тканям в месте забора [1, 2]. Альтернативой аутоотрансплантации или пластики слизистой оболочки могут быть имплантации биологически активных материалов в зону дефекта с последующим ожиданием эпителизации скаффолда с краевых зон раны. В клинической практике стоматологов, дерматологов и хирургов в США широко используется децеллюлированная, специально очищенная от антигенов, человеческая дерма AlloDerm, которая предназначена для стимуляции процессов заживления слизистых оболочек и кожи [3, 4]. Кроме того, помимо скаффолдов для восстановления кожи в широкую практику были внедрены и клеточные аллотрансплантаты, ярким примером которых может служить Arligraf. Являясь живыми эквивалентами кожи, они зарекомендовали себя хорошо как в эстетической медицине, так и в комбустиологии [5, 6]. Использование клеточных технологий в хирургической стоматологии кажется само собой разумеющимся делом.

Исследовательская группа Университета Кобэ (Япония) продемонстрировала возможность использования аутоотрансплантатов для восстановления дефектов слизистой оболочки полости рта у пятнадцати пациентов с лейкоплакией, плоскоклеточным раком полости рта и атрофией слизистой оболочки в области альвеолярного гребня. Клеточный материал получали путем биопсии, кератиноциты выделяли, культивировали и наносили на AlloDerm. Средний размер дефектов составлял порядка 6 см². Эпителизация наступала в среднем через 28 дней, что, по наблюдениям авторов, быстрее и эффективнее, чем просто имплантация AlloDerm. Кроме клинических данных эффективность метода была подтверждена биопсией. Результаты гистологического исследования продемонстрировали наличие развитого эпителиального слоя у пациентов после аутоотрансплантации, тогда как эпителиальной выстилки на поверхности бесклеточной матрицы AlloDerm выявлено не было. В конце срока наблюдения (1 мес.) также была выявлена минимальная контрактура у пациентов после аутоотрансплантации.

Таким образом, данное наблюдение свидетельствует о клинической эффективности метода трансплантации аутогенных кератиноцитов на бесклеточной дермальной матрице AlloDerm в сравнении с имплантацией той же матрицы носителя, но без клеток. Однако в исследовании остался нераскрытым вопрос: безопасно ли использовать подобные клеточные трансплантаты у онкологических пациентов. Внедрение в клиническую практику данного метода в Японии сильно ограничено в связи с отсутствием разрешения на использование матрицы AlloDerm, о чем и заявили авторы.