ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Испытания новых тканеинженерных кровеносных сосудов в экспериментальных моделях

Общепринятым «золотым стандартом» лечения сердечно–сосудистых заболеваний, обусловленных облитерацией сосудов, являются шунтирующие операции, представляющие собой обход или замену участка сужения за счет трансплантатов и реваскуляризацию зоны ишемии. В кардиохирургии в качестве трансплантата чаще всего используют участок подкожной вены (реваскуляризация сердца и нижних конечностей) и также внутренней грудной артерии для «обхода» коронарных артерий [1]. К сожалению, около 30% пациентов не обладают подходящими для трансплантации венами [1]. В связи с этим возникает необходимость создания альтернативных трансплантатов, которые бы соответствовали всем необходимым биологическим и механическим характеристикам собственных сосудов пациентов.

Основными качествами идеального трансплантата должны быть его биологическая совместимость, прочность, гипоаллергенность и гипоиммуногенность, отсутствие токсичности, низкая стоимость, отсутствие тромбогенности. Однако к настоящему времени ни один из разработанных заменителей сосудов не обладает этими качествами в полной мере [2]. Синтетические, аллогенные и ксеногенные сосуды провоцируют тромбозы, отторжение, хроническое воспаление и имеют весьма посредственные механические свойства. В качестве альтернативы было предложено наносить слой эндотелия на искусственные полимерные протезы на основе политетрафлуороэтилена (ПТФЭ) и полиэтилена тетрафталата. Эндотелизация таких протезов увеличивает биосовместимость конструкции, значительно снижая риск тромбозов и рестенозов. На оформленные синтетические каркасы наносятся матрикс, обеспечивающий нормальную адгезию и пролиферацию клеток и собственные эндотелиальные клетки пациента. Однако «сосуды», полученные таким методом (эндотелизированные протезы), способны обеспечивать нормальную гемоциркуляцию только в течение 3–5 лет и менее чем в 50% случаев [2].

Революционным направлением в сосудистой хирургии может стать применение полноценных тканеинженерных конструкций. Такие биоискусственные сосуды представляют собой дву– или трехслойные тканево–клеточные структуры, выращиваемые в особых условиях *in vitro* на полом цилиндрическом биодеградируемом матриксе. Первым этапом на биополимер наслаивают гладкомышечные клетки стенки артерий, затем – эндотелиальные клетки и третий слой (присутствующий не всегда) – адвентицию. Конструкция культивируется в специальных биореакторах в режиме «пульсирующей гидродинамической струи» около месяца. В ряде лабораторий такие конструкции были созданы и испытаны *in vivo* [3]. Уже несколько лет идут клинические испытания тканеинженерных сосудистых графтов, предназначенных, однако, только для протезирования крупных сосудов [3–6]. Замена сосудов меньшего диаметра (менее 6 мм во внутреннем диаметре) остается на данный момент практически нерешенной проблемой в связи с тромбогенностью графтов, провоцируемой ими гиперплазией интимы и атеросклеротическими изменениями [7]. Биоинженерия в этой области пока остается в основном на уровне экспериментов *in vitro* или использовании животных моделей.

Разрабатываются все новые и новые подходы к проблеме создания тканеинженерных сосудов из аутогенных клеток человека. Недавно группой L'Heureux была предложена новая модель создания таких трансплантатов и получены многообещающие результаты при их испытаниях *in vivo*. Результаты исследования опубликованы в журнале Nature Medicine.

Для создания трансплантатов исследователи использовали человеческие фибробласты, выделенные из биопсийного материала кожи пациентов с тяжелыми формами сердечно–сосудистых заболеваний. Эти трансплантаты были получены новым методом так называемой «послойной тканевой инженерии». Фибробласты культивировались в условиях, стимулирующих продукцию хорошо организованного внеклеточного матрикса, который формировал плотный «листок», с легкостью отделявшийся от поверхности культурального пластика. Такие «листки», состоящие из внеклеточного матрикса и клеток, могут в дальнейшем использоваться для конструирования трехмерной модели сосуда, обладая всеми необходимыми механическими качествами [8]. Для этого «листки» последовательно оборачивались вокруг временной основы из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием, а затем освобождались от фибробластов и засевались клетками эндотелия. В итоге получалась модель, состоящая из адвентиции, бесклеточной внутренней мембраны и эндотелиального внутреннего слоя. Такой биоинженерный сосуд имел внутренний диаметр 4,2 мм при толщине стенки 407 мкм. Испытания физических свойств *in vitro* (через модель пропускался поток жидкости) подтвердили его прочность.

Затем свойства потенциального графта были проверены *in vivo*. Сначала человеческие графты (с внутренним диаметром 1,5 мм) были пересажены иммунонекомпетентным крысам (nude) в область абдоминальной части аорты (анастомоз). 12 из 14 «двуслойных» трансплантатов успешно интегрировались в окружающие ткани. Кровотечения обнаружено не было, равно как и сужения просвета сосуда или образования аневризм. Диаметр сосуда оставался стабильным на протяжении всего эксперимента (6 месяцев) и, несмотря на отсутствие применения антикоагулянтов, в 85% процентах случаев не было отмечено образования тромбов. Гистологический анализ трансплантата на 90–й день от начала эксперимента показал целостность мембраны и отсутствие лейкоцитарной инфильтрации. То есть ее матрикс не обладал иммуногенными свойствами и не провоцировал воспалительной реакции, часто приводящей к стенозу. К шестому месяцу толщина сосудистой стенки и внутренний диаметр графта также не изменились. Ультраструктурное исследование выявило организацию клеток и экстраклеточного матрикса, характерные для нормальных тканей. В адвентиции были обнаружены клетки, положительные по α–актину, что может указывать на возможное участие в регенерации гладкомышечных клеток, мигрировавших из мест анастомозов, а также циркулирующих в крови прогениторных клеток.

Сосуды с внутренним диаметром 4,2 мм показали хорошие биомеханические и биологические свойства в стандартном эксперименте (на фоне иммуносупрессии и тромболитиков) по

созданию анастомозов на 4 собаках. Чтобы проверить качества трансплантата в более близком к человеческому биомеханическом окружении, графты с внутренним диаметром 4,2 мм были имплантированы трем макакам, которым предварительно была проведена иммуносупрессия. Ультразвуковое исследование, компьютерная томография–ангиография и биопсии подтвердили, что все сосуды не были подвержены клеточной инфильтрации и не демонстрировали никаких признаков сужения или образования аневризм. На гистологических срезах был заметен умеренный иммунный ответ, образование артерио–артериальных анастомозов и покрытая нормальным эндотелием внутренняя мембрана. Также были найдены позитивные по α–актину клетки в составе адвентиции. Более того, такие же клетки присутствовали и в окружающей сосуды ткани.

Таким образом, с использованием оригинального методического подхода (послойное формирование сосуда) были разработаны тканеинженерные трансплантаты, в полной мере обладающие необходимыми для клинического применения качествами. В экспериментах *in vivo* сосуды продемонстрировали достаточно высокую прочность, стимулировали регенерацию и ангиогенез, препятствовали развитию аневризм. Нормальный эндотелий, выстилающий внутреннюю поверхность графта препятствовал тромбозам и не подвергался лимфоидной инфильтрации.

Это исследование максимально приближено к клиническим условиям, поскольку сосуды полностью были «сконструированы» из собственных клеток пациентов. Кроме того, сосуды были испытаны сразу в трех *in vivo* моделях (крыса, собака, обезьяна). Другим неоспоримым преимуществом работы является то, что авторы изучали «судьбу» сосудов в течение длительного времени – полгода после трансплантации. Можно предположить, что в клинике такие сосуды могут «прослужить» длительное время без развития осложнений. Впервые модель была опробована на приматах, то есть в биомеханическом окружении, практически на 100% соответствующем условиям организма человека. Разработанные трансплантаты успешно зарекомендовали себя в замене поврежденных сосудов и далее могут проходить клинические испытания, которые должны подтвердить эффективность конструкции у пациентов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Taylor L.M. Jr, Edwards J.M., Porter JM. Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series. J. Vasc. Surg. 1990; 11: 193–205.
2. Baguneid M.S., Seifalian A.M., Salacinski H.J. et al. Tissue engineering of blood vessels. Brit. J. Surg. 2006; 93: 282–90.
3. Shin'oka T. Clinical results of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. Nippon Geka Gakkai Zasshi 2004; 105: 459–63.
4. Hibino N., Imai Y., Shin'oka T. et al. [First successful clinical application of tissue engineered blood vessel]. Kyobu Geka 2002; 55: 368–73.
5. Naito Y., Imai Y., Shin'oka T. et al. Successful clinical application of tissue-engineered graft for extracardiac Fontan operation. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2003; 125: 419–20.
6. Matsumura G., Hibino N., Ikada Y. et al. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. Biomat. 2003; 24: 2303–8.
7. Isenberg B.C., Williams C., Tranquillo R. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. Circ. Res. 2006; 98: 25–35.
8. L'Heureux N., Paquet N., Labbe R. et al. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. FASEB J. 1998; 12: 47–56.

Подготовила А.С. Григорян
По материалам Nat. Med. 2006; 12: 361–5

Технология создания сердечных клапанов с использованием собственных клеток пуповины ребенка

Одна из основных проблем современной кардиохирургии – протезирование клапанов сердца у детей с врожденными пороками. Синтетические протезы кроме известных общих недостатков (тромбообразованиие, разрушение форменных элементов крови, реакция ткани на инородное тело) не могут изменять размер с ростом ребенка и подлежат замене через каждые 5 лет, что не может, не отразиться на здоровье и качестве жизни [2, 4, 7]. В настоящее время идет активный поиск новых материалов и технологий для создания протезов сердечных клапанов нового поколения.

Методы тканевой инженерии позволяют создавать трехмерные эквиваленты сердечных клапанов с использованием как синтетических материалов (PGA), так и биологических (бесклеточный матрикс клапанов свиньи) с нанесенными на них различными типами клеток [1, 3, 6]. В качестве клеточного материала в конструкциях для создания клапанов используют мультипотентные мезенхимальные клетки костного мозга, гемопоэтические стволовые клетки, ядросодержащую фракцию костного мозга, эндотелиальные клетки, миобласты и фибробласты [5]. Полученная тканеинженерная конструкция обычно помещается в биореактор в условия пульсирующей струи для правильной ориентации мышечных волокон и синтеза внеклеточного матрикса, что значительно укрепляет графт и приближает условия культивирования к естественным (кровоток) [8].

Стремление исследователей к созданию эквивалентов тканей из аутогенных клеток обусловлено лучшей приживляемостью трансплантата, отсутствием иммунных реакций и риска генетической и микробной контаминации, что делает технологию привлекательней, но одновременно и усложняет ее. Поскольку тканеинженерные клапаны часто необходимы детям с врожденными пороками развития, то альтернативой клеткам костного мозга может служить клеточный материал, выделенный из внезародышевых органов, таких как плацента или пуповина.

В журнале Annals of Thoracic Surgery опубликовано исследование немецких авторов, где впервые описана технология создания тканеинженерной конструкции трехмерных эквивалентов сердечных клапанов с использованием инертных материалов и криконсервированных клеток пуповины человека.