

В.Н. Александров¹, Т.А. Камилова¹, Д.В. Фирсанов¹,
Л.И. Калюжная¹, А.В. Кривенцов¹,
А.А. Кондратенко¹, М.А. Фигуркина²

Тканевая инженерия трахеи

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

Резюме. Излагаются результаты исследований по созданию биоинженерной трахеи как живого эквивалента аллогенного трансплантата для больных, в нем нуждающихся. В соответствии с концепцией тканевой инженерии для создания подобного эквивалента необходимы три компонента – каркас, органоспецифические клетки, которыми он будет заселен, и биореактор для «вызревания» перед трансплантацией засеянного клетками каркаса. Считается, что оптимальным каркасом для анатомо-функционального восстановления трахеи является каркас донорской трахеи, полученный путем децеллюляризации. Детергентно-ферментативная обработка донорской трахеи, выполненная «мягко», помимо полного удаления иммуногенного материала, в целом сохраняет не только белковый состав межклеточного матрикса трахеи, но и микроархитектонику его и достаточную механическую прочность, что обеспечивает благоприятные условия для последующей рецеллюляризации. Клетки для рецеллюляризации могут быть получены из различных источников, в том числе аутологических хряща, эпителия и стволовых клеток костного мозга. Клетки, засеянные на каркас и помещенные в биореактор – устройство, имитирующее условия пребывания трахеи *in vivo*, пролиферируют, дифференцируются под влиянием факторов пролиферации и дифференцировки, сохраненных в каркасе, до формирования «зрелой» биоинженерной трахеи, достаточной по своим морфофункциональным свойствам для трансплантации. Результаты трансплантаций биоинженерной трахеи в эксперименте и в клинике в рамках ограниченных испытаний демонстрируют потенциальную полезность тканевой инженерии трахеи и большой терапевтический потенциал этого направления клеточных технологий в целом. Однако в тканевой инженерии трахеи остается много нерешенных проблем, например, как сохранить долгосрочные структурные свойства биоинженерной трахеи, сводя к минимуму реакции отторжения, как оптимизировать культивирование и дизайн биореактора, обеспечить адгезионные и пролиферативные функции засеянных клеток, реэпителизацию и реваскуляризацию.

Ключевые слова: тканевая инженерия, биоинженерная трахея, регенерация дыхательных путей, децеллюляризация, рецеллюляризация, биореактор, детергентно-ферментативная обработка, матрикс трахеи, каркас, хондроциты, мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки костного мозга.

Введение. Трахея состоит из хрящевой ткани, охватывающей 2/3 окружности (оставшаяся треть – из гладких мышц), респираторного эпителия, соединительной ткани и кровеносных сосудов. Хрящ трахеи обеспечивает механические свойства и стабильность просвета дыхательных путей, в то время как респираторный эпителий осуществляет мукоцилиарный клиренс [17, 24].

Болезни, как врожденные, так и приобретенные, а также травмы этого органа – не редкость. Травмы трахеи небольшой площади восстанавливаются за счет миграции клеток из краев раны; травмы площадью более нескольких миллиметров завершаются деформацией просвета трахеи. Хронические заболевания слизистых оболочек верхних дыхательных путей приводят к стенозу и обструктивной дыхательной недостаточности [11]. Лечение опухолей головы и шеи, ежегодно диагностируемые у 650000 человек, предполагает у многих из этих пациентов резекцию значительной части мягких тканей, включая верхние дыхательные пути.

Общепризнанным стандартом лечения пациентов с патологией трахеи является создание прямого анастомоза на месте резекции дефекта. Однако у

взрослых успешность реконструкции возможна при дефектах не длиннее 5–6 см, у детей этот предел еще меньше. В этой связи вполне объяснимо положение, согласно которому осложнения и смертность реконструктивных операций на трахее прямо зависят от длины иссеченного дефекта и соответственно длины анастомоза [26]. Однако аллотрансплантация трахеи ограничена острым дефицитом донорских органов и риском осложнений, первой летальных, иммунного порядка. Разрабатываемые методы лечения, например, формирование трахеального кондуита из различных тканей и материалов, включая аутогенный, аллогенный, протезные материалы или их комбинации, также имеют ограничения. Например, использование кожно-мышечного аутоотрансплантата, не покрытого слоем реснитчатого эпителия и секретирующих клеток и потому неспособного к мукоцилиарному клиренсу, приводит к угрожающей жизни обструкции дыхательных путей слизью. Доступные протезы не способны в достаточной степени имитировать свойства нативных тканей, неполно интегрируются с тканями реципиента и подвергаются экстружии [11, 17, 24].

Создание биоинженерной трахеи (БИТ), как альтернативы трансплантации донорской трахеи, пред-

ставляет собой технологический процесс, последовательно включающий такие этапы, как этап подготовки иммунологически инертного бесклеточного каркаса, этап получения и накопления органоспецифических клеток пациента и, наконец, этап заселения матрикса накопленными клетками и культивирования его до конечного продукта, максимально близкого по своей структуре и функции к естественной трахее. В таком виде персонифицированный биоинженерный орган может быть трансплантирован пациентам с недостаточностью верхних дыхательных путей [7, 11, 17, 24].

Матрикс представляет собой уникальную для каждого органа [3] трехмерную структуру, состоящую из молекул коллагена разного типа, ламинина, фибронектина, протеогликанов, но лишенную функционирующих клеток, свойственных нативному органу. Формируя пространственную структуру каркаса и биомеханические характеристики органа [11], белковые молекулы матрикса создают условия для фиксации на нем хондроцитов, реснитчатого эпителия, эндотелиоцитов, пролиферацию этих клеток и дифференцировку их предшественников, без чего невозможны ни физиологическая, ни репаративная его и органа в целом регенерация [23, 25]. Матрикс с порадами достаточного размера обеспечивает равномерное распределение не только клеток, но и субстратов по всему объему ткани [24]. Скорость его деградации в идеале должна соответствовать скорости формирования нового матрикса клетками, репопулирующими его *in vivo* [17].

Децеллюляризация – способ получения бесклеточного каркаса с упомянутыми свойствами. Она осуществляется детергентно-ферментативной обработкой трахеи донора. Чаще других используют две группы реактивов: детергент, например, дезоксихолат натрия, растворяющий клеточные мембраны с локализованными на них основными антигенами гистосовместимости (HLA-антигены) [6, 27], и ферменты, например, дезоксирибонуклеаза (ДНКазы) I, расщепляющая нуклеиновые кислоты [15, 21], и трипсин, расщепляющий белковые компоненты клеток, частично разрушенные детергентом [9, 23].

Продолжительность децеллюляризации трахеи зависит от особенностей органа у экспериментальных животных разного возраста и видов и у человека. У взрослых крыс длина трахеи около 15 мм. Образец трахеи крысы, содержащий не менее 10 хрящевых полуколец, подвергали продолжительной децеллюляризации. Она включала в себя 72-часовой этап отмывки дистиллированной водой, многократные 48-часовые циклы, состоящие из 4-часового воздействия 4% раствора дезоксихолата при комнатной температуре, 3-часового воздействия при температуре 37°C раствора ДНКазы в концентрации 5000 ед/мл в растворе (1 mM) хлорида натрия и отмывки дистиллированной водой в течение 41 часа. В последнем цикле продолжительность отмывки дистиллированной водой увеличили до 72 ч. Результаты иммуногистохимического анализа показали, что после первого цикла антигены

главного комплекса гистосовместимости отсутствовали в слизистой, подслизистой, адвентиции и были обнаружены лишь в хрящевой ткани. Полное удаление указанных маркеров наблюдалось только после пяти циклов, тем не менее, в хрящевой ткани осталось небольшое количество ядер и в лакунах – клеточные обломки. Гистоархитектура хряща, базальной мембраны и подслизистой в основном сохранилась [26]. Таким образом, матрикс трахеи в целом теряет способность вызывать иммунный ответ после пяти 48-часовых циклов децеллюляризации.

Большая продолжительность децеллюляризации трахеи объясняется особенностями гистологической структуры органа. Хондроциты и хондробласты окутаны уплотненным межклеточным веществом с обилием волокнистых структур. Поэтому детергенты и ферменты контактируют с клетками хрящевой ткани только после разрушения волокон межклеточного вещества и качественной отмывки их остатков. Длительная децеллюляризация сопровождается потерей важных компонентов внеклеточного матрикса. Так, гликозаминогликан (ГАГ) – второй после коллагена II типа белок матрикса [12, 21], определяет эластические свойства ткани. Потеря ГАГ после децеллюляризации составила 47% от их содержания в нативной трахее. Видимо, этим обстоятельством объясняется изменение некоторых биомеханических свойств каркаса. В частности, эластические упругие свойства бесклеточного матрикса трахеи крысы, подвергнутой 5 циклам децеллюляризации, были снижены (при испытании образца на сжатие и растяжение) в сравнении с нативной трахеей. В то же время по прочности матрикс не отличался от нативного органа [26].

Продолжительное детергентно-ферментативное воздействие, помимо удаления клеток с поверхностей органа и хрящевых клеток из толщи трахеи, приводит к частичной потере белков матрикса (ламинин, коллаген и фибронектин), которые способствуют клеточной адгезии, миграции, дифференцировке посеянных на матрикс клеток, поэтому только щадящая децеллюляризация обеспечивает возможность дальнейших процессов в технологической цепи создания биоинженерного органа – его рецеллюляризации и «созревания» [25]. Очевидно, описанный протокол децеллюляризации следует считать щадящим, так как обнаруженные ультраструктурные нарушения на поверхностях матрикса заметно не влияют на адгезию и рост посеянных респираторных эпителиоцитов и способность мезенхимальных стволовых клеток к хондрогенной дифференцировке. Цитотоксичность матрикса по отношению к посеянным клеткам отсутствовала [26].

У животных крупных видов трахея имеет большую длину и толщину стенки. Длина трахеи свиньи около 10 см и сопоставима с длиной трахеи взрослого человека. Децеллюляризация такого органа потребовала 25 циклов. При этом макро- и микроскопическое строение трахеи не пострадало (рис. 1). Однако минимальный ядерный материал и плохо растворимые

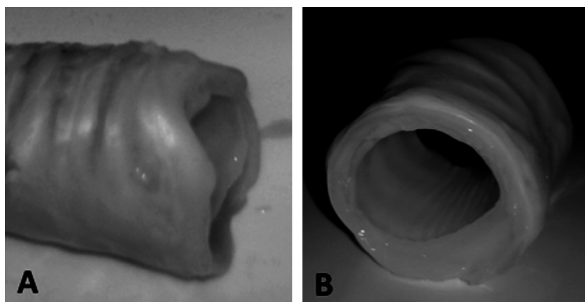


Рис. 1. Трахея свиньи до (А) и после (В) децеллюляризации [21]

компоненты цитоскелета оставались в хрящевой ткани [21]. В этом контексте уместно напомнить, что многие коммерчески доступные каркасы иммунопривилегированных тканей (сосудов, клапанов сердца) для нужд регенеративной медицины также содержат оставшиеся после децеллюляризации фрагменты ДНК [15]. Наличие в децеллюляризованных тканях фрагментов ДНК длиной не более 300 пар оснований принято считать достаточно безопасным [8].

Определение общего коллагена не выявило количественных различий в его содержании в децеллюляризованном матриксе и нативной трахее. На микрофотографиях хряща трахеи ориентация коллагеновых волокон оказалась сходной с таковой в нативной трахее, однако имела место потеря ГАГ, как при децеллюляризации трахеи крыс. С увеличением количества циклов децеллюляризации происходит снижение упругости, жесткости и предела прочности при растяжении по сравнению с нативной трахеей. Изменение биомеханических свойств становится статистически значимым после 25 циклов [21]. Однако 22 циклов достаточно для полной децеллюляризации при условии выполнения водной фазы процедуры. Без этого этапа полная децеллюляризация не достигается даже после 25 циклов [3, 19].

Трахея человека на разных возрастных этапах имеет разные размеры, диаметр просвета, пространственную форму и толщину хрящевой части стенки. У новорожденного трахея длиной 3,2–4,5 см воронкообразной формы, с диаметром просвета около 8 мм. Задняя стенка трахеи, лишенная хрящей, более широкая относительно трахеи взрослого, хрящи тонкие и мягкие. Длина трахеи взрослого человека до 13 см, диаметр просвета 15–18 мм.

Основываясь на опыте децеллюляризации трахеи крупных животных, исследовали эффективность удаления клеток после 17 и более циклов децеллюляризации. После 25 циклов морфологические и биомеханические свойства матрикса были подобны характеристикам нативной трахеи, почти все клеточные элементы исчезли, были обнаружены только несколько хондроцитов. S. Baiguera [3] полагает, что присутствие единичных клеточных элементов в хрящевой зоне децеллюляризованного матрикса трахеи может обеспечить необходимые регуляторные сигналы как

для трансплантата, так и для клеток реципиента. Гистоархитектура матрикса трахеи с неповрежденными коллагеновыми волокнами на внешней поверхности и интактной люминальной базальной мембраной была сохранной. Целостная структура базальной мембраны обеспечивает множество биологических функций, регулирует проницаемость, клеточное поведение и дифференцировку посредством молекулярного сигнала. 25 циклов децеллюляризации занимают 30 дней, однако при необходимости длительность отдельных шагов можно регулировать с сохранением количества циклов, чтобы осуществить процесс за 17 дней. Биомеханическая прочность каркаса трахеи значительно снижается только после 27 циклов, т.е. после того, как нарушается биомеханическая целостность. Хранение бесклеточного каркаса в течение года в фосфатном буфере при 4°C также привело к значительному изменению свойств матрикса и снижению механической прочности пространственной структуры.

Реагенты, используемые в процессе децеллюляризации, цитотоксичны по своей природе. Поэтому представлялось важным оценить столь долго подготавливаемый каркас на предмет химической безопасности для клеток в связи с последующей его рецеллюляризацией. Оказалось, что экстракты интактных и децеллюляризованных трахей, добавленные в культуру стволовых клеток костного мозга, были одинаково безопасны. Более того, клетки, инкубированные с экстрактом матрикса, показали парадоксально высокую способность к пролиферации по сравнению с контролем [26]. Возможно, описанный эффект предопределен способностью некоторых ростовых факторов, например, bFGF (basic fibroblast growth factor), оставаться в матриксе при децеллюляризации, высвобождаться и активироваться во время его деградации [2].

Сохранность уникальной архитектоники внеклеточного матрикса, включая находящиеся в нем ростовые факторы, определяет эффективность следующего этапа создания биоинженерного органа – *рецеллюляризации*, и в конечном итоге судьбу трансплантированного реципиенту заселенного клетками каркаса – его отторжение или приживание [9, 22].

В настоящее время нет единого мнения относительно оптимального типа клеток для тканевой инженерии трахеи. Предпочтение отдается аутологичным дифференцированным хондроцитам из хряща трахеи, носовой перегородки, колена, уха и ребра, эндогенным тканеспецифичным клеткам-предшественникам и особенно мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам костного мозга (ММСК КМ) благодаря их высокому пролиферативному и дифференцировочному потенциалу и самой низкой иммуногенности [14]. Преимуществом хряща носовой перегородки является возможность получить из одного биоптата три типа клеток для трехмерного тканевого конструкта. В тех случаях, когда доступность назального хряща ограничена, например, у детей, можно использовать ММСК КМ [17]. Вероятно,

необходимо сочетание различных типов клеток, которое варьирует в зависимости от органов и тканей [1]. Совместное культивирование хондроцитов носовой перегородки и ММСК КМ в соотношении 1:1 повышает их способность регенерировать связки по сравнению с популяциями, культивируемыми независимо [17]. Фибробласты, интегрированные в бесклеточный каркас, увеличивают скорость регенерации и плотность респираторного эпителия [13, 16], хотя их влияние на дыхательный эпителий БИТ *in vivo* неясно и требует уточнения [11].

Для выяснения роли эпителиальных клеток и хондроцитов в поддержании жизнеспособности БИТ сегменты трахеи свиней были ортотопически заменены децеллюляризованным матриксом (группа I), децеллюляризованным матриксом с хондроцитами, полученными из аутологичных МСК КМ (группа II), децеллюляризованным матриксом с аутологичными эпителиальными клетками внутри (группа III) или децеллюляризованным матриксом, засеянным клетками обоих типов (группа IV). БИТ изготовлены детергентно-ферментативным методом (дезоксихолат натрия + ДНКаза I). После операции животных наблюдали в течение 60 дней. Продолжительность выживания животных разных групп была различной: в группе I – 11 ± 2 дня, в группе II – 29 ± 4 дня, в группе III – 34 ± 4 дня и в группе IV – 60 ± 1 день. Причиной смерти было сочетание обструкции дыхательных путей и инфекции (группа I), в основном инфекции (группа II) или в основном стеноза (группа III). Все животные IV группы были живы, без признаков спадения дыхательных путей, ишемии и отторжения, несмотря на отсутствие иммуносупрессии. Это свидетельствует о том, что аутологичные хрящевые и эпителиальные клетки совместно обеспечивают жизнеспособность и функционирование конструкта, в основе которого находится бесклеточный матрикс. Для выживания трансплантата необходим посев и хондроцитов, и респираторных эпителиоцитов. Только заселение обеих сторон матрикса привело к получению здорового функционального трансплантата. Гистологические и макроскопические данные коррелируют с клиническим исходом у животных. Трансплантация БИТ без клеток или только с одним типом клеток приводит к недостаточности дыхательных путей. Предимплантационные пробы на растяжение не выявили существенной разницы между БИТ и нативной трахеей. Однако эксплантированные БИТ групп I–III (но не группы IV) показали статистически более низкую эластичность по сравнению с нативной трахеей. Таким образом, биомеханические характеристики трансплантированных конструктов существенным образом зависят от состава клеток, засеянных на бесклеточный каркас в процессе рецеллюляризации [9].

Каркасы трахеи крыс засеяли ММСК КМ, индуцированными к хондрогенной дифференцировке в среде, содержащей факторы TGF- β 3 (transforming growth factor- β 3) и BMP-2 (bone morphogenetic protein-2). Через 24 часа после посева наблюдали прикрепление и дифференцировку ММСК КМ на наружной поверх-

ности каркаса. Для заселения люминальной поверхности каркаса использовали только эпителиоциты, свежееизолированные из слизистой оболочки трахеи крысы, так как уже во 2-м пассаже клеточной культуры большинство эпителиоцитов дифференцировались в фибробластоподобные клетки. Посеянные клетки пролиферировали и образовали многослойную структуру в течение 2 недель даже без водно-воздушного интерфейса. На поверхности некоторых клеток дыхательного эпителия имелись кластеры интактных ресничек. Полученные таким способом БИТ были полностью лишены HLA-антигенов при сохранении структурной стабильности и имплантированы в подкожные карманы верхней части спины крыс для оценки иммунного ответа. Животных наблюдали для выявления клинических признаков воспаления или отторжения в течение 4 недель, а затем эксплантировали трансплантат. В подслизистой и перитрахеальной ткани обнаружена обильная реваскуляризация. БИТ были частично кальцинированы и без клеточной репопуляции в сохранившихся лакунах хряща или формирования нового хряща. Авторы отмечают, что, во-первых, БИТ не вызывает иммунных реакций, во-вторых, реэпителизация конструкта происходит даже в отсутствие водно-воздушного интерфейса, но хондроциты, дифференцированные из ММСК КМ, не приживляются по данной методике [26, 27].

Неизвестно, выживает ли эпителиальный слой после трансплантации биоинженерной трахеи реципиенту, или он заменяется эпителием, мигрирующим от края раны реципиента, подобно тому, как это происходит при эндотелизации тканеинженерных сосудов. Иммуногистохимический анализ мышинных аллотрансплантатов трахеи показал инфильтрацию БИТ клетками реципиента с последующей полной регенерацией слизистого слоя эпителием реципиента. Эпителий мигрирует внутрь от края раны [13], но данных о судьбе эпителиальных клеток биоинженерных трансплантатов *in vivo* не найдено [11].

Таким образом, бесклеточный матрикс трахеи представляет собой благоприятную среду для прикрепления к нему и пролиферации хондроцитов и клеток дыхательного эпителия. Условия для пространственного распределения клеток, аналогичного нативному, их фенотипического созревания создает инкубация каркаса в биореакторе [1].

Биореактор – вращающееся устройство, позволяющее засеивать обе стороны трансплантата с интерфейсом воздух – жидкость для стимулирования дифференцировки мерцательного эпителия дыхательных путей. Группа P. Macchiarini [19] разработала биореактор для одновременного посева и культивирования различных типов клеток по обе стороны трубчатого матрикса, доставки питательных веществ и удаления отходов и обеспечивающего биомеханические сигналы в виде сдвига гидродинамического напряжения. Два типа клеток требуют различных условий культивирования, поэтому биореактор состоит из двух отсеков, каждый с газо-жидкостным интерфей-

сом. Устройство поворачивает бесклеточный каркас вокруг его продольной оси в культуральной среде, удовлетворяющей потребности обоих типов клеток, и перемещает клетки попеременно в жидкую (среда) и газовую (воздух) фазы (рис. 2).

Культуральная среда непрерывно перемешивается для усиления оксигенации и обмена веществ. Через 24 ч в биореакторе эпителиальные клетки и хондроциты глубоко встраиваются в матрикс, а в культуральной среде ни живые, ни мертвые не были обнаружены, т.е. имело место 100% прикрепление. Общий срок культивирования в биореакторе составил 96 ч. В цитологических образцах с обеих поверхностей кондукта можно было увидеть жизнеспособные эпителиальные клетки и хондроциты, несмотря на структурную обособленность двух камер биореактора. Последнее обстоятельство, свидетельствующее о способности клеток к миграции через всю толщу трансплантата в течение короткого времени, демонстрирует, что у животных упорядоченные архитектурные связи между различными типами клеток в БИТ не являются необходимыми для функционального излечения [28]. Исследование Р. Macchiarini [19] позволяет распространить это положение на человека.

Среди факторов, которые важны для регенерации тканей *in vivo*, ангиогенный потенциал БИТ может играть самую важную роль, особенно в начальной фазе трансплантации, так как гипоксия из-за плохой васкуляризации является одним из основных факторов риска отторжения. Каркас должен поддерживать ре-васкуляризацию, следовательно, сохранение структур базальной мембраны в их правильной анатомической локализации имеет важное значение для облегчения васкулогенеза или ангиогенного вставания сосудов. Ортотопическая ре-васкуляризация БИТ происходит быстро, за несколько недель. Этот период времени допускается в связи с относительно низкой потреб-

ностью в кислороде хондроцитов и продолжающимся контактом эпителия с воздухом [5, 9, 19, 21].

Индикатором ангиогенного потенциала бесклеточного каркаса является наличие в нем bFGF. Для изучения ангиогенного потенциала матрикса исследовали его хемоаттрактантные свойства путем посева эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) в камеру биореактора, отделенную пористой мембраной от камеры с децеллюляризованным матриксом. Показано, что матрикс значительно увеличивает миграцию HUVEC через мембрану биореактора по сравнению с негативным контролем. Чтобы проверить способность матрикса к формированию сосудистой сети, его фрагменты помещали на хориоаллантоиновую мембрану куриного яйца. На 2-й день инкубации образцы матрикса были окружены сосудами, растущими из мембраны радиально в направлении имплантата подобно спицам колеса, на 4-й день – полностью окутаны сосудами. Наличие новых сосудов в петлях вокруг матрикса еще раз свидетельствует, что бесклеточный каркас позитивно влияет на рост и организацию сосудистой сети [3]. Считается, что протеоглики защищают ангиогенные факторы от удаления с матрикса при децеллюляризации.

Клинические исследования. Первый клинический успех трансплантации ксеногенной БИТ был зарегистрирован в 2004 г. Сегмент тощей кишки свиньи, децеллюляризованный детергентно-ферментативным методом и засеянный *in vitro* аутологичными мышечными клетками и фибробластами реципиента, был успешно использован для реконструкции дефекта трахеи у 58-летнего пациента, функционально и морфологически интегрировался в дыхательные пути без признаков хронического воспаления, инфекции, грануляционной ткани или эрозии [20]. В 2008 г. Р. Macchiarini и др. [19] первыми описали успешную клеточную репопуляцию аллогенной децеллюляриро-

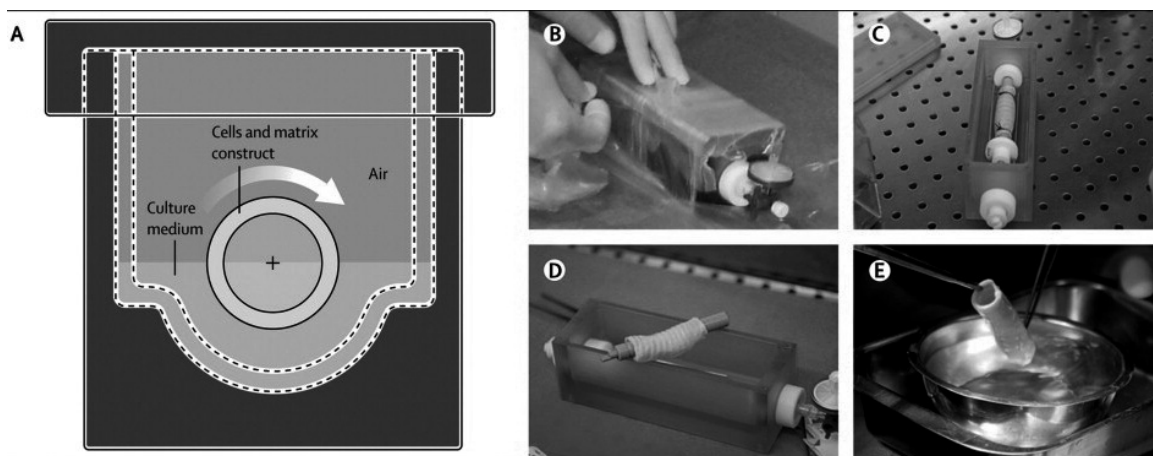


Рис. 2. Биореактор для рецеллюляризации трахеи [19]: А – схема вращения ДЦТ вокруг продольной оси. Конструкция имеет отдельные камеры для просвета и наружной поверхности трахеи; В – герметизированный биореактор; С – биореактор с трансплантатом; D – биореактор после удаления трансплантата; Е – готовый трансплантат непосредственно перед хирургической имплантацией

ванной трахеи для реконструкции стенозированного сегмента левого главного бронха и трахеи у 30-летней женщины с вторичной посттуберкулезной тяжелой бронхомаляцией. Они использовали БИТ (децеллюляризация дезоксихолатом натрия + ДНКаза, 25 циклов), засеянную хондроцитами и клетками реснитчатого дыхательного эпителия, дифференцированными из аутологичных ММСК. Подтверждены проангиогенные свойства БИТ: через 4 дня после имплантации в ней образовалась густая сеть микрососудов. Эпителизацию наблюдали через месяц, мукоцилиарный клиренс – через 6 месяцев. Иммуноокрашивание на ламинин и трансмиссионная электронная микроскопия подтвердили наличие сплошной базальной мембраны и мелких кровеносных сосудов. Вызванное биопсией кровотечение слизистых через месяц после имплантации считается признаком успешной реваскуляризации [19]. В 2014 г. группа опубликовала результаты 5-летнего наблюдения данной пациентки. Через 12 месяцев после трансплантации в нативной трахее развился прогрессирующий рубцовый стеноз вблизи анастомоза нативной трахеи с БИТ, связанный с частичной потерей механической целостности трахеи, который потребовал повторного эндолуминального стентирования. Однако сама БИТ оставалась открытой по всей длине, хорошо васкуляризированной, полностью рецеллюляризированной с нормальной мукоцилиарной функцией ресничек. Все показатели функции внешнего дыхания оставались в пределах нормы 44 месяца после трансплантации БИТ. Затем развился сильный неразрешимый кашель и хрипы, связанные с обструкцией верхних дыхательных путей и субокклюзионным стенозом в местах анастомозов, которые потребовали повторных эндолуминальных дилатаций без стентирования. Сегодня пациентка имеет проходимую БИТ с бессимптомным подсвязочным стенозом. Однако рецидивирующий рубцовый стеноз развился в нативной трахее вблизи анастомоза с БИТ. Это не поддается лечению и сорвало попытку сделать жизнь пациентки полностью свободной от регулярной бронхоскопии. Не считая бронхоскопических вмешательств, пациентка ведет нормальную социальную и трудовую жизнь и не имеет инвалидности. Тератомы, связанные со стволовыми клетками, антидонорские антитела и серологические признаки отторжения отсутствуют даже без иммуносупрессии. Улучшение функции легких, нормальные кашлевая чувствительность и сила выталкивания свидетельствуют об отсутствии значительного нарушения иннервации дыхательных путей через 5 лет после трансплантации [10].

В дальнейшем P. Jungebluth, P. Macchiarini [14] провели серию трансплантаций БИТ 9 пациентам, страдающим от различных заболеваний дыхательных путей. В течение 12 месяцев у 3 пациентов выявлены непредвиденные механические нарушения. Авторы отметили как отрицательные стороны технологии БИТ – зависимость от наличия доноров, длительность обработки (децеллюляризация длится 2–3 недели, что

не уместно для больных со злокачественными заболеваниями, нуждающихся в неотложном лечении), так и биомеханическую дегенерацию, особенно длинных сегментов, которые требуют повторного стентирования из-за клинически наблюдаемой нестабильной биомеханики.

Метод был усовершенствован за счет сокращения времени, необходимого длядецеллюляризации трахеи, и использования организма реципиента как биореактора: децеллюляризированные каркасы человеческой трахеи интраоперационно засеивали аутологичными клетками дыхательного эпителия и мононуклеарными клетками КМ [7, 18], ММСК КМ с ростовыми факторами [4]. Этот *in vivo* тканеинженерный подход был использован у взрослых больных и детей с доброкачественными и злокачественными заболеваниями дыхательных путей. За 12–42 месяца наблюдения не зарегистрировано случаев смерти, связанной с трансплантатом, все трансплантаты имели сосудистую сеть и здоровую слизистую дыхательных путей. Однако, хотя первоначальные результаты были многообещающими (трансплантаты васкуляризировались и полностью реэпителизировались), у 30% пациентов наблюдался частичный инспираторный стеноз проксимального отдела трансплантата. Предположительно, это связано с трансмембранной миграцией хондроцитов, дифференцировавшихся из стволовых клеток с наружной стороны децеллюляризированной трахеи (хондроцитарный компартмент) во внутренний (эпителиальный) компартмент по градиенту концентрации кислорода, который формируется во всей БИТ [4].

M.J. Elliott и др. [7] использовали аллогенный бесклеточный каркас трахеи для замены 7 см сегмента трахеи у мальчика 10 лет с врожденным стенозом трахеи. После 3-дневного курса гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) для мобилизации и индукции пролиферации СК и эндотелиальных предшественников у пациента были взяты мононуклеарные клетки КМ и посеяны на децеллюляризованный каркас трупной трахеи непосредственно во время трансплантации. Лоскуты слизистой оболочки с иссеченного сегмента трахеи были помещены на люминальную поверхность каркаса через регулярные интервалы. Для стимуляции ангиогенеза трансплантат пропитали человеческим рекомбинантным эритропоезином и Г-КСФ. Для привлечения аутологичных ММСК и индукции хондрогенной дифференцировки в кольца трахеи ввели фактор TGF- β , ключевой сигнал для хондроцитарной дифференцировки МСК, который должен способствовать репопуляции сохранившихся в каркасе хряща ниш и обеспечить адекватную долгосрочную биомеханическую поддержку. Внутривенное введение эритропоетина было продолжено в послеоперационном периоде. Трансплантат, стабилизированный постоянным нитиновым стентом, реваскуляризировался в течение недели после операции. Через 8 недель после операции был отмечен сильный нейтрофильный ответ на местном уровне. Пациенту

Таблица

Требования к идеальному заместителю трахеи

Общие свойства	Неиммуногенность, нетоксичность, неонкогенность, способность обеспечить клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, репопуляция, ремоделирование, регенерация, рост, синхронизированный с ростом пациента.
Специфические для трахеи свойства	Герметичность и непроницаемость для жидкости, достаточная механическая прочность (способность адекватно реагировать на продольные и поперечные силы), поддержание формы и контура просвета для проходимости дыхательных путей и функции дыхания.
Механические свойства, присущие нативной трахее	$\pm 75^\circ$ (правое/левое вращение при максимальном сгибании 0°). Сгибание/разгибание $70^\circ/60^\circ$ и предел деформации 40% (изгиба при сгибании – расширении). 40%:20% для сжатия/растяжения. Поперечный (вправо/влево) изгиб: 48° и ожидаемый предел деформации 40%.

выполняли бронхоскопию или баллонную дилатацию регулярно в течение 6 месяцев. Цитологические признаки восстановления эпителия появились через год. Через 15 месяцев после операции произошла полная эпителизация без бронхоэктазов или воздушных ловушек, клетки реснитчатого эпителия были полностью жизнеспособны. Через 18 месяцев после операции компьютерная томография и вентилиционно-перфузионная сцинтиграфия показали нормальное состояние грудной клетки, отсутствовали серологические и клинические признаки отторжения трансплантата и анти-HLA антитела, пациент вырос на 11 см и не нуждался в каком-либо медицинском вмешательстве. Через 2 года наблюдения у него были функциональные дыхательные пути, и он вернулся в школу [7]. Как и в случае взрослого пациента [19], через неделю после трансплантации было видно кровотечение на внутренней поверхности трансплантата, которое указывает на быстрое развитие кровеносных сосудов [7]. Однако обоим реципиентам требовались стенты для поддержания проходимости дыхательных путей. В конечном итоге результаты пре- и клинических испытаний позволили сформулировать требования, предъявляемые к биоинженерной трахее (табл.).

Заключение. Для создания БИТ существуют необходимые и достаточные условия: 1) бесклеточный каркас БИТ должен быть способным инициировать ангиогенез, репопуляцию БИТ предшественниками органоспецифичных клеток и пролиферацию засеянных клеток; 2) методики получения в короткие сроки органоспецифичных для трахеи клеток должны быть минимально инвазивными и простыми. Имплантат БИТ должен обладать герметичной структурой, надлежащей гибкостью и жесткостью, способностью к росту в организме пациента, что особенно важно для пациентов детского возраста, и не вызывать иммунные реакции.

На сегодня ни одно из исследований в области тканевой инженерии трахеи не было полностью клинически успешным [17]. В тканевой инженерии трахеи остается много нерешенных проблем, например, как сохранить долгосрочные структурные свойства БИТ,

сводя к минимуму реакции отторжения, как оптимизировать культивирование и дизайн биореактора, обеспечить адгезионные и пролиферативные функции засеянных клеток, реэпителизацию и реваскуляризацию [4]. Как показал опыт трансплантации БИТ человека, процесс исцеления может сопровождаться серьезными осложнениями [19]. По этой причине в качестве ведущей цели при репарации длинных сегментов трахеи следует рассматривать трансплантацию БИТ с полностью функциональной слизистой оболочкой.

Литература

1. Badylak, S.F. Engineered whole organs and complex tissues / S.F. Badylak [et al.] // *Lancet*. – 2012. – Vol. 379, № 9819. – P. 943–952.
2. Badylak, S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material / S.F. Badylak // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28, № 25. – P. 3587–3593.
3. Baiguera, S. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation / S. Baiguera // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31, № 34. – P. 8931–8938.
4. Baiguera, S. Upper airways regeneration and bioengineering. Chapter 53 / S. Baiguera, P. Macchiarini // *Regenerative medicine applications in organ transplantation. Part VIII. Composite tissues allotransplantation*. – 2014. – P. 747–759.
5. Curcio, E. Oxygen mass transfer in a human tissue-engineered trachea / E. Curcio [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31, № 19. – P. 5131–5136.
6. Elder, B.D. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs / B.D. Elder [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30, № 22. – P. 3749–3756.
7. Elliott, M.J. Stem cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study / M.J. Elliott [et al.] // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380, № 9846. – P. 994–1000.
8. Gilbert, T.W. Quantification of DNA in biologic scaffold materials / T.W. Gilbert [et al.] // *J. surg. res.* – 2009. – Vol. 152, № 1. – P. 135–139.
9. Go, T. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs / T. Go [et al.] // *J. thorac. cardiovasc. surg.* – 2010. – Vol. 139, № 2. – P. 437–443.
10. Gonfiotti, A. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results / A. Gonfiotti [et al.] // *Lancet*. – 2014. – Vol. 383, № 9913. – P. 238–244.
11. Hamilton, N. Tissue engineering airway mucosa: a systematic review / N. Hamilton [et al.] // *Laryngoscope*. – 2014. – Vol. 124, № 4. – P. 961–968.

12. Haykal, S. Evaluation of the structural integrity and extracellular matrix components of tracheal allografts following cyclical decellularization techniques: comparison of three protocols / S. Haykal [et al.] // Tissue eng. – 2012. – Vol. 18, № 8. – P. 614–623.
13. Heikal, M.Y. Autologous implantation of bilayered tissue-engineered respiratory epithelium for tracheal mucosal regeneration in a sheep model / M.Y. Heikal [et al.] // Cells tissues organs. – 2010. – Vol. 192, № 5. – P. 292–302.
14. Jungebluth, P. Airway transplantation / P. Jungebluth, P. Macchiarini // Thorac. surg. clin. – 2014. – Vol. 24, № 1. – P. 97–106.
15. Keane, T.J. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response / T.J. Keane [et al.] // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33, № 6. – P. 1771–1781.
16. Kobayashi, K. Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro / K. Kobayashi [et al.] // Tissue eng. – 2006. – Vol. 12, № 9. – P. 2619–2628.
17. Kojima, K. Tissue engineering in the trachea / K. Kojima, C.A. Vacanti // Anat. rec. – 2014. – Vol. 297, № 1. – P. 44–50.
18. Laurence, J. British boy receives tracheal transplant with his own cells / J. Laurence // BMJ. – 2010. – Vol. 340. – P. 1633.
19. Macchiarini, P. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway / P. Macchiarini [et al.] // Lancet. – 2008. – Vol. 372, № 9655. – P. 2023–2030.
20. Macchiarini, P. First human transplantation of a bioengineered airway tissue / P. Macchiarini [et al.] // J. thorac. cardiovasc. surg. – 2004. – Vol. 128, № 4. – P. 638–641.
21. Partington, L. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds / L. Partington [et al.] // Acta biomater. – 2013. – Vol. 9, № 2. – P. 5251–5261.
22. Remlinger, N.T. Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction / N.T. Remlinger [et al.] // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, № 13. – P. 3520–3526.
23. Schwarz, S. Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue engineering applications / S. Schwarz [et al.] // Tissue eng. Part A. – 2012. – Vol. 18, № 21/22. – P. 2195–2209.
24. Shin, Y.S. Tissue-engineered tracheal reconstruction using chondrocyte seeded on a porcine cartilage-derived substance scaffold / Y.S. Shin [et al.] // Int. j. ped. otorhinolaryngol. – 2014. – Vol. 78, № 1. – P. 32–38.
25. Simon-Assmann, P. Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis / P. Simon-Assmann [et al.] // Int. j. dev. biol. – 2011. – Vol. 55, № 4–5. – P. 455–465.
26. Zang, M. Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering / M. Zang [et al.] // Plast. reconstr. surg. – 2012. – Vol. 130, № 3. – P. 532–540.
27. Zang, M. Decellularized tracheal matrix scaffold for tracheal tissue engineering: in vivo host response / M. Zang [et al.] // Plast. reconstr. surg. – 2013. – Vol. 132, № 4. – P. 549e–559e.
28. Zani, D.G. Tissue-engineered endothelial and epithelial implants differentially and synergistically regulate airway repair / D.G. Zani [et al.] // Proc. natl. acad. sci. USA. – 2008. – Vol. 105, № 19. – P. 7046–7051.

V.N. Alexandrov, T.A. Kamilova, D.V. Firsanov, L.I. Kalyuzhnaya, A.V. Kriventsov, A.A. Kondratenko, M.A. Figurkina

Trachea tissue engineering

Abstract. We present the results of research on creating bioengineered trachea as the living equivalent of the allogeneic transplant for patients who need it. In accordance with the concept of tissue engineering, 3 components are needed for creation of such equivalent: scaffold, organ specific cells, which will be seeded onto scaffold, and bioreactor for «maturation» of cell-seeded scaffold before transplantation. It is assumed today, that decellularized donor trachea is an optimal scaffold for its anatomical-functional recovery. «Soft» detergent-enzymatic treatment of donor trachea besides of complete removing of immunogenic material, retains not only tracheal extracellular matrix protein composition, but also its micro-architecture, and sufficient mechanical properties, which all together provides a favorable conditions for its subsequent recellularization. Cells for recellularization could be obtained from various sources, including autologous cartilage, epithelium and bone marrow stem cells. As scaffold contains factors of proliferation and differentiation, cells, seeded onto it and placed in bioreactor – a device that simulates the environment of trachea in vivo, are able to proliferate, and differentiate until formation of «mature» bioengineered trachea which will be sufficient on its morphological and functional properties for transplantation. Results of bioengineered trachea transplantation in experiment and, within limited tests, in clinic demonstrate a potential usefulness of tissue-engineered trachea and, in general, a great therapeutic potential of this field of regenerative medicine. However, many challenges remain in the tissue-engineered trachea, such as how to maintain the long-term structural properties of bioengineered trachea, minimizing rejection reactions, and how to optimize culturing bioreactor design, to ensure adhesion and proliferative function seeded cells, re-epithelialization and neovascularization.

Key words: tissue engineering, bioengineered trachea, airway regeneration, decellularization, recellularization, bioreactor, detergent-enzymatic treatment, trachea matrix, scaffold, chondrocytes, bone marrow multipotent mesenchymal stem cell.

Контактный телефон +7-921-935-74-66; e-mail: vnaleks9@yandex.ru