

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Барановский Денис Станиславович

**Создание тканеинженерных конструкций для
восстановления критических дефектов трахеи**

14.01.17 – Хирургия

14.03.03 – Патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Паршин Владимир Дмитриевич

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Людуп Алексей Валерьевич

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ХИРУРГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ ТРАХЕИ (обзор литературы).....	13
1.1. Анатомия трахеи.....	13
1.2. Рубцовые стенозы трахеи. Современные подходы к лечению.....	17
1.3. Роль и место имплантатов дыхательных путей в реконструкции критических дефектов трахеи.....	19
1.4. Тканевая инженерия трахеи. Основные понятия. История создания тканеинженерных трансплантатов.....	27
Заключение по Главе 1.....	41
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1. Дизайн исследования, общая характеристика материалов и методов исследования.....	43
2.2. Биологические материалы, использованные для изготовления матриксов-носителей.....	48
2.3. Девитализация биологических материалов для получения бесклеточных матриксов.....	49
2.4. Модификация структуры бесклеточных матриксов на основе хрящевой ткани трахеи человека на уровне микроархитектоники.....	50
2.5. Стерилизация готовых матриксов носителей.....	51
2.6. Оценка цитотоксичности матриксов-носителей.....	53
2.7. Морфологические и аналитические методы исследования.....	54
2.7.1. Гистологическое исследование и световая микроскопия.....	54
2.7.2. Иммунофлуоресцентное окрашивание.....	55
2.7.3. Конфокальная микроскопия.....	56
2.7.4. Сканирующая электронная микроскопия.....	56
2.8. Получение и накопление клеточных ресурсов для ревитализации матриксов-носителей.....	56
2.8.1. Получение и культивирование мезенхимальных стромальных клеток костного мозга кролика.....	56
2.8.2. Получение и культивирование мерцательного эпителия кролика.....	57
2.8.3. Оценка фенотипа мезенхимальных стромальных клеток костного мозга кролика и мерцательного эпителия легких кролика.....	58
2.8.4. Выделение, культивирование и оценка фенотипа назальных хондроцитов человека.....	59
2.8.5. Выделение и культивирование назальных хондроцитов кролика.....	61

2.9. Ревитализация матриксов-носителей и создание тканеинженерных конструкций – тканеинженерной трахеи кролика.....	61
2.9.1. Ревитализация матриксов-носителей на основе тканей трахеи кролика.....	61
2.9.2. Ревитализация матриксов-носителей на основе хрящевой ткани трахеи человека.....	62
2.10. Разработка экспериментальной хирургической модели критического дефекта трахеи для оценки эффективности применения тканеинженерных конструкций различных типов.....	63
2.11. Имплантации тканеинженерной трахеи кролика <i>in vivo</i>	65
2.11.1. Выполнение ортотопических имплантаций тканеинженерной трахеи кролика.....	65
2.11.2. Оценка состояния тканеинженерной трахеи кролика <i>in vivo</i>	67
2.11.3. Вывод животных из эксперимента и забор тканеинженерной трахеи для морфологического анализа.....	67
2.12. Имплантации тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи человека <i>in vivo</i>	68
2.12.1. Гетеротопические имплантации тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи человека.....	68
2.12.2. Ортотопические имплантации тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи.....	68
2.12.3. Вывод животных из эксперимента и забор тканеинженерной конструкции для морфологического анализа.....	71
2.13. Критерии оценки физиологической совместимости.....	71
и эффективности тканеинженерной конструкции.....	71
2.14. Статистическая обработка.....	72
Заключение по Главе 2.....	72

Глава 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ.....	74
3.1. Разработка тканеинженерной конструкции трахеи.....	74
3.2. Создание тканеинженерной трахеи кролика на основе заселенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и клеток легочного эпителия девитализированного матрикса.....	75
3.2.1. Девитализация трахеи кролика.....	75
3.2.2. Создание тканеинженерной трахеи кролика и оценка приживления тканеинженерной трахеи после имплантации в ортотопическую позицию..	76
3.3. Получение тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи человека.....	81

3.3.1. Оценка бесклеточных матриксов-носителей на основе кадаверных хрящевых тканей человека с применением методов микроструктурой модификации лазерным излучением (лазерное травление).....	81
3.3.2. Исследование образцов тканеинженерной конструкции.....	85
3.3.3. Исследование качества ревитализации и биосовместимости тканеинженерной конструкции после имплантации <i>in vivo</i> в гетеротопическую позицию.....	87
3.3.4. Исследование эффективности тканеинженерной конструкции при имплантации <i>in vivo</i> в ортотопическую позицию с закрытием дефекта стенки трахеи.....	90
Глава 4.	
ОБСУЖДЕНИЕ.....	93
4.1. Достаточность использованных в работе материалов и методов для решения поставленных задач.....	93
4.2. Систематизация существующих подходов к созданию тканеинженерной конструкции трахеи и восстановительных операций.....	95
4.3. Свойства и характеристики матриксов-носителей для тканеинженерной конструкции.....	97
4.4. Ревитализация матриксов-носителей клеточными культурами.....	101
4.5. Биологическая и физиологическая совместимость и эффективность тканеинженерной трахеи и тканеинженерной конструкции хрящевой ткани..	102
4.5.1. Биологическая и физиологическая совместимость и эффективность тканеинженерной трахеи кролика.....	102
4.5.2. Биологическая совместимость тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи человека.....	103
4.6. Эффективность применения тканеинженерных конструкций различных типов в условиях экспериментальной хирургической модели критического дефекта трахеи.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115
БЛАГОДАРНОСТИ.....	126

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации

Реконструктивная хирургия трахеи является одной из областей в практической медицине, где восстановление и длительное сохранение физиологических функций органа может быть достигнуто путем использования современных возможностей не только торакальной хирургии, но и клеточных технологий и тканевой инженерии. Обеспечение физиологической и биологической совместимости тканеинженерных конструкций, используемых для замещения поврежденных органов или их тканей, является основным принципом применения методов тканевой инженерии в хирургической практике (Grillo H. et al., 2002; Neville W. et al., 1990).

Последние данные свидетельствуют о том, что пациенты с протяженным рубцовым стенозом остаются сложной группой больных с хирургическими заболеваниями трахеи. Их частота значительно возросла в последние годы из-за расширенных возможностей реанимации, позволяющих лечить чрезвычайно тяжелых пациентов с применением длительной искусственной вентиляции легких через эндотрахеальную или трахеотомическую трубку (Papla B., et al., 2003). Хирургическое лечение протяженных стенозов и дефектов трахеи, составляющих более 50% длины трахеи у взрослых или 30% у детей, сопряжено с повышенным риском тяжелых и даже фатальных осложнений. При этом обширные резекции связаны с повышенным риском чрезмерного натяжения сшиваемых тканей, послеоперационной несостоятельности анастомозов и гнойным процессом в средостении (Berg M. et al., 2012; Мосин И. В. и др., 2011). Пригодного трансплантата трахеи, которым можно заменить обширные пострезекционные дефекты трахеальной трубки, в настоящее время не существует. Таким образом, имплантация тканеинженерной трахеи представляется перспективным направлением и может оказаться последним шансом для определенной группы пациентов с тотальным или субтотальным стенозом трахеи. Тканеинженерные трансплантаты трахеи были предметом исследований с 1990-х годов (Vacanti J. et al., 1994; Cull D. et al., 1990). Однако, несмотря на широкое распространение

исследований и сравнительно большое количество клинических испытаний, все существующие подходы не смогли решить проблему создания оптимального трансплантата. Предложенные ранее методы имели ограниченный успех из-за ряда проблем, включающих в т. ч. ненадлежащую плотность хряща в бесклеточных матриксах и потери механических свойств, приводящей к прогрессирующему размягчению, рецидивам рубцового стенозирования просвета трахеи, а также плохой эпителиальной колонизации (Hamilton T. et al., 2015). Возможности эффективной ревитализации хрящевых тканей также непосредственно ограничиваются неспособностью клеток к миграции в глубину плотного богатого гликозаминогликанами межклеточного вещества (Lehmann J. et al., 2019).

Создание новой технологии получения тканеинженерной конструкции трахеи и отдельных ее компонентов является ключевым вопросом в разработке пригодного трансплантата.

Цель исследования: создать тканеинженерные конструкции для закрытия критических дефектов трахеи в эксперименте, основу которых составляют девитализированные ткани, ревитализация которых может обеспечиваться непосредственной адгезией клеток на поверхности физиологически совместимого материала или обеспечением условий для клеточной миграции применением методов лазерного травления тканей.

Задачи исследования

1. Создать биodeградируемую и биосовместимую трехслойную тканеинженерную конструкцию – тканеинженерную трахею (ТИТ) на основе девитализированных тканей, мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК КМ) и клеток легочного эпителия (КЛЭ), изучить ее свойства.

2. Выполнить имплантации ТИТ лабораторным животным в ортотопическую позицию, оценить биосовместимость и эффективность ТИТ при реконструкции критических дефектов стенки трахеи животных в эксперименте.

3. Создать высокоплотные матриксы-носители путем девитализации и лазерного травления естественного хряща трахеи, полученного от человеческого трупного донора.

4. Создать тканеинженерную конструкцию (ТИК) хрящевой ткани трахеи человека на основе матриксов-носителей, заселенных человеческими назальными хондроцитами.

5. Изучить биологическую совместимость и качество ревитализации *in vivo* для ТИК при гетеротопических имплантациях лабораторным животным.

6. Выполнить имплантации ТИК лабораторным животным в ортотопическую позицию и изучить физиологическую совместимость и эффективность данной ТИК при реконструкции критических дефектов стенки трахеи животных в эксперименте.

Вид научного исследования. Научное исследование в рамках настоящей диссертационной работы носит экспериментальный доклинический характер, в ходе которого создавались тканеинженерные конструкции на основе девитализированных кадаверных материалов с ревитализацией клеточными компонентами (мезенхимальные стромальные клетки костного мозга, клетки легочного эпителия, назальные хондроциты), которые имплантировались лабораторным животным (бестимусные мыши, кролики) с целью оценки биологической и физиологической совместимости и эффективности конструкций.

Объект исследования и планируемое количество наблюдений. Объектом исследования стали трехслойные тканеинженерные трахеи (ТИТ) кролика ($n = 8$), кадаверные материалы, подвергнутые лазерному травлению ($n = 8$), тканеинженерные конструкции (ТИК) хрящевой ткани трахеи человека, полученные на основе кадаверных материалов ($n = 16$), а также тканевая реакция организма бестимусных мышей ($n = 3$) и кроликов породы «Серый великан» ($n = 11$) на имплантацию тканеинженерных конструкций и их компонентов в гетеро- и ортотопическую позиции с закрытием критического дефекта трахеи.

Научная новизна. Проведена оценка возможностей ревитализации девитализированных тканей трахеи кролика легочным эпителием. Было

установлено, что трехслойная ТИТ кролика может быть создана путем двусторонней поверхностной ревитализации. Причем наружная поверхность матрикса-носителя заселена сингенными МСК КМ, а внутренняя – клетками легочного эпителия. Имплантация ТИТ кролика лабораторному животному-реципиенту (кролик породы «Серый великан») при моделировании критического дефекта стенки трахеи не показала признаков отторжения трансплантата, развития рубцового стеноза просвета, трахеомалиции, выраженного воспаления тканей, или миграции ТИК.

Впервые на основе хрящевой ткани трахеи человека разработана усовершенствованная ТИК хрящевой ткани трахеи, созданная из кадаверного материала, подвергнутого высокоточному лазерному травлению, с ревитализацией назальными хондроцитами человека *in vitro*.

Эффективность и безопасность тканеинженерной конструкции данного типа впервые исследована не только в рамках подкожного приживления, но и при ортотопических имплантациях с непосредственным закрытием критического дефекта стенки трахеи лабораторного животного данной конструкцией.

Получены патенты на изобретения «Способ ускоренной децеллюляризации биологической ткани или органа» (RU 2714327) и «Способ оценки жизнеспособности тканеинженерной конструкции при закрытии критического дефекта трахеи на модели экспериментального животного» (RU 2730924).

Практическая значимость

Разработана универсальная экспериментальная хирургическая модель критического дефекта стенки трахеи и модель оценки эффективности ТИК, пригодная для использования в рамках доклинических исследований.

Впервые разработан и обоснован дизайн ТИТ и ТИК трахеи, предназначенных для пластического закрытия критических дефектов стенки трахеи и предотвращения возникновения поздних послеоперационных осложнений при восстановительных операциях в виде рубцовых стенозов трахеи и трахеомалиции. Предложенные в настоящей работе подходы к созданию матриксов-носителей для получения хрящевой ткани трахеи человека могут быть

использованы при разработке ТИТ новых типов и различных имплантируемых протезов дыхательных путей.

Метод лазерного травления может использоваться для изготовления матриксов носителей для ТИ хрящевой ткани трахеи человека, соответствующих свойствам нативных хрящевых тканей.

Разработана методика ревитализации матрикса-носителя ТИК назальными хондроцитами, обеспечивающая колонизацию матрикса клетками в течение 7 дней с поддержанием жизнедеятельности и миграции адгезированных клеток в лунки матрикса. Разработанные методы формирования ревитализированных носителей могут применяться для создания ТИК различных хрящевых тканей человека.

Разработанный способ оценки жизнеспособности ТИК при закрытии критического дефекта трахеи может применяться в трансплантологии и экспериментальной хирургии для оценки ТИК полых органов.

Настоящая работа выполнена в рамках проекта «Экспериментальное исследование безопасности и биосовместимости тканеинженерной конструкции на основе натурального бесклеточного плотного матрикса и назальных хондроцитов человека, при ортотопической и гетеротопической имплантации *in vivo*», реализуемого в Первом МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России и Университетском госпитале Базеля по соглашению о субсидии № 14.614.21.0001 (ID RFMEFI61417X0001) Минобрнауки России (руководитель проекта – Заведующий отделением торакальной хирургии Университетской клиники № 1, чл.-корр. РАН, д. м. н., профессор Паршин В. Д.).

Положения, выносимые на защиту

1. Критический дефект переднебоковой стенки трахеи с резекцией пяти хрящевых колец может использоваться в качестве экспериментальной хирургической модели для оценки эффективности ТИК трахеи при ортотопической имплантации.

2. Прекультивированные сингенные КЛЭ могут быть использованы для ревитализации матриксов-носителей с формированием жизнеспособного эпителиального покрытия на внутренней поверхности ТИТ.

3. ТИТ на основе МСК КМ и КЛЭ биосовместимы и способны к эффективному функциональному замещению естественных тканей при закрытии критического дефекта трахеи в эксперименте.

4. Созданные методом лазерного травления матриксы-носители обеспечивают возможность эффективной ревитализации *in vitro* путем культивирования назальных хондроцитов человека на матриксе-носителе в статической культуре.

5. ТИК хрящевой ткани трахеи человека, созданные на основе матриксов-носителей, подвергнутых лазерному травлению, биосовместимы.

6. Качество ревитализации ТИК, созданных на основе матриксов-носителей, подвергнутых лазерному травлению, может быть улучшено при имплантации *in vivo*.

7. ТИК хрящевой ткани трахеи человека, созданные на основе матриксов-носителей, подвергнутых лазерному травлению, способны к эффективному замещению трахеальной стенки при реконструкции критического дефекта трахеи в эксперименте.

Апробация результатов исследования

Апробация диссертации состоялась 29 мая 2020 г. на совместном заседании Кафедры факультетской хирургии Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского и Отдела передовых клеточных технологий Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Материалы и основные положения работы докладывались и обсуждались на международных конференциях по специальностям «Патологическая физиология» и «Хирургия», в том числе Международной научной конференции «TERMIS World Congress 2018» (г. Киото. Япония, 4–7 сентября 2018 г.), международном хирургическом конгрессе «Jahreskongress der Schweizerischen Gesellschaft für Chirurgie» (г. Берн, Швейцария, 15–17 мая 2019 г.), международной конференции торакальных хирургов «27th ESTS Meeting 2019» (г. Дублин. Ирландия, 09–12 июня 2019 г.).

Результаты научного исследования представлены российскому клиническому сообществу на научной конференции международного уровня – 10th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy (13–16 сентября 2018 г., г. Москва, Сеченовский университет) – в устном докладе научного руководителя проекта – д. м. н., проф. В. Д. Паршина «Трансплантация трахеи – анатомические, экспериментальные и клинические исследования».

Достоверность научных положений и выводов. Представленные в работе результаты основаны на данных, полученных с использованием современных методов клеточной биологии, тканевой инженерии и экспериментальной хирургии, в том числе флуоресцентной микроскопии, компьютерной микротомографии с трехмерной реконструкцией, сканирующей электронной микроскопии и оценки жизнеспособности клеточных культур.

Личный вклад автора. Автором внесен определяющий вклад во все этапы диссертационного исследования, в том числе в проведение анализа литературных данных по теме диссертации, разработку дизайна данного исследования, проведение экспериментальных работ и экспериментальных хирургических операций на лабораторных животных, анализ и интерпретацию полученных данных. Часть исследований выполнена совместно с научными коллективами Отдела передовых клеточных технологий Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России и лаборатории тканевой инженерии Института хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре факультетской хирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), в практическую деятельность Отдела передовых клеточных технологий ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России и практическую деятельность Института хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля (Швейцария).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспортам специальности 14.01.17 –

«Хирургия» и специальности 14.03.03 – «Патологическая физиология». Результаты проведенного исследования соответствуют паспорту специальности «Хирургия», конкретно п. 4 «Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения хирургических болезней и их внедрение в клиническую практику» и паспорту специальности «Патологическая физиология», конкретно п. 4 «Изучение механизмов, лежащих в основе различных исходов и осложнений болезни; анализ причин развития неполного выздоровления и формирования на этой основе последующего состояния предболезни».

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы в изданиях, индексируемых Scopus и рекомендованных ВАК для опубликования материалов диссертаций на соискание ученой степени.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 126 страниц, включает 34 рисунка, 4 схемы, 1 таблицу и список литературы из 99 источников.

Глава 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ХИРУРГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ ТРАХЕИ (обзор литературы)

1.1. Анатомия трахеи

Понимание топографической анатомии трахеи важно при разработке, планировании и выполнении хирургических вмешательств на органе. Трахея имеет длину от 9 до 16 см и способна несколько увеличиваться за счет растяжения при запрокидывании головы. Просвет трахеи имеет размер 15–20 мм в поперечном сечении и 11–15 мм в сагиттальном. Таким образом, форма трахеи подобна трубке, лишенной радиальной симметрии (Перельман М., 1972).

Являясь продолжением гортани, трахея берет начало на уровне шестого шейного позвонка и оканчивается бифуркацией на правый и левый бронхи у верхнего края пятого грудного позвонка, подразделяясь таким образом на шейный и грудной отделы. Передняя стенка трахеи образована 16–20 неполными хрящевыми полукольцами, соединенными фиброзными связками. Задняя или перепончатая стенка преимущественно представлена пучками поперечно исчерченной мышечной ткани, обеспечивающими сокращения трахеи при дыхании и кашле.

Спереди к трахее прилежит претрахеальная пластинка шейной фасции, отграничивающей грудинно-подъязычные и грудинно-щитовидные мышцы, и, на уровне 2–4-го полуколец, щитовидная железа. Задняя стенка трахеи контактирует с пищеводом, а с обеих сторон в непосредственной близости шейного отдела трахеи проходят крупные сосудисто-нервные пучки, включающие в себя общие сонные артерии, яремные вены и десятую пару черепно-мозговых нервов. Грудной отдел трахеи проходит позади дуги аорты, плечеголового ствола и тимуса, а его боковые стенки отграничены медиастинальной плеврой (Кованов В., 1985). Наглядная демонстрация анатомии трахеи приведена на Рисунке 1.1.

Внутренний просвет трахеи, имеющий непосредственный контакт с воздухом, выстлан слизистой оболочкой, представленной преимущественно клетками псевдомногослойного эпителия с мерцательным эпителием, синхронные движения ресничек которого обеспечивают мукоцилиарный клиренс или

ретроградный ток слизистого секрета, что создает естественную санацию и биологическую защиту нижележащих отделов дыхательной системы от патогенных микроорганизмов и мельчайших инородных тел. Подслизистая основа состоит из рыхлой соединительной ткани, здесь находятся лимфатические фолликулы и трахеальные железы.

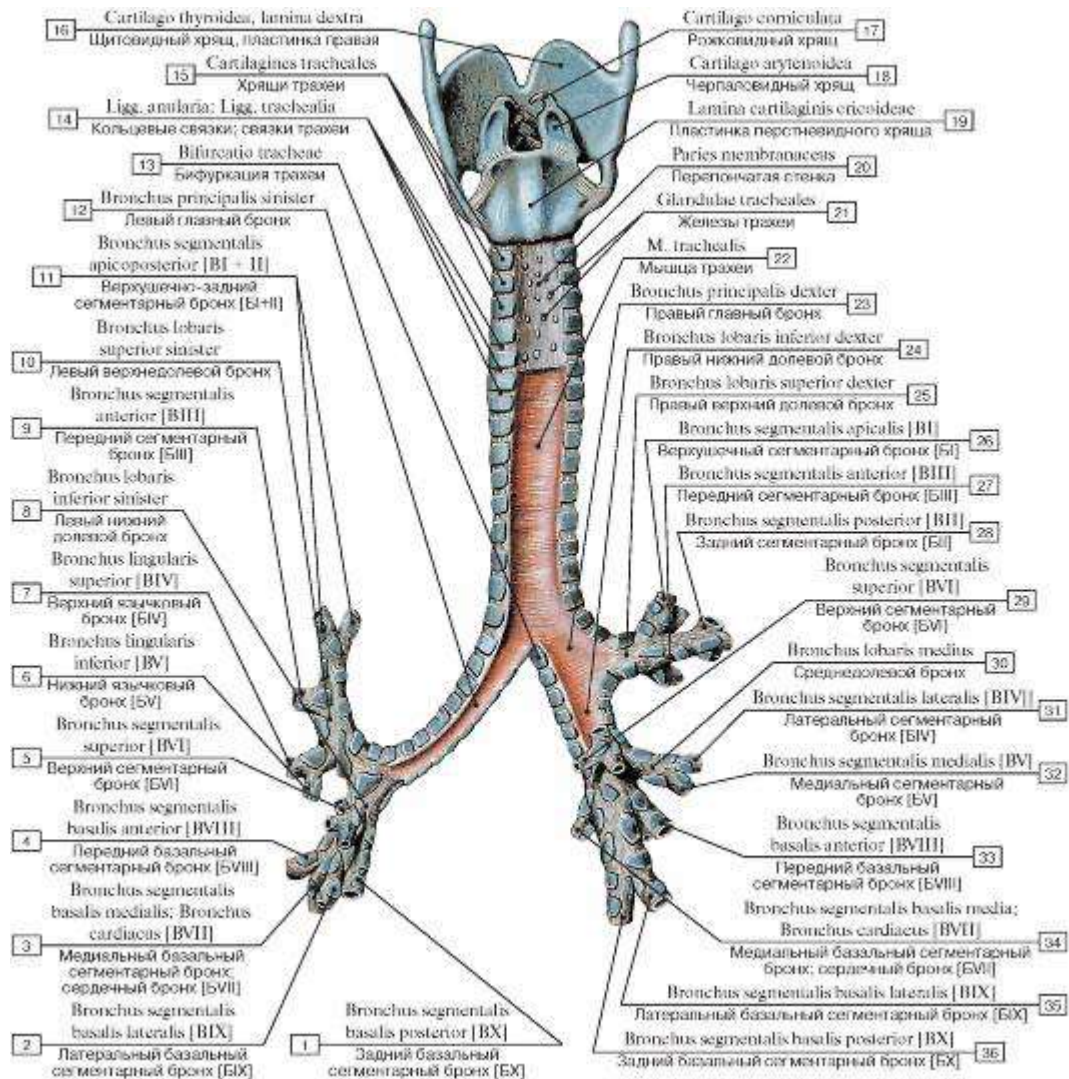


Рисунок 1.1. – Анатомия гортани, трахеи и бронхов человека.

Рисунок по Г. Билич, 2008 г.

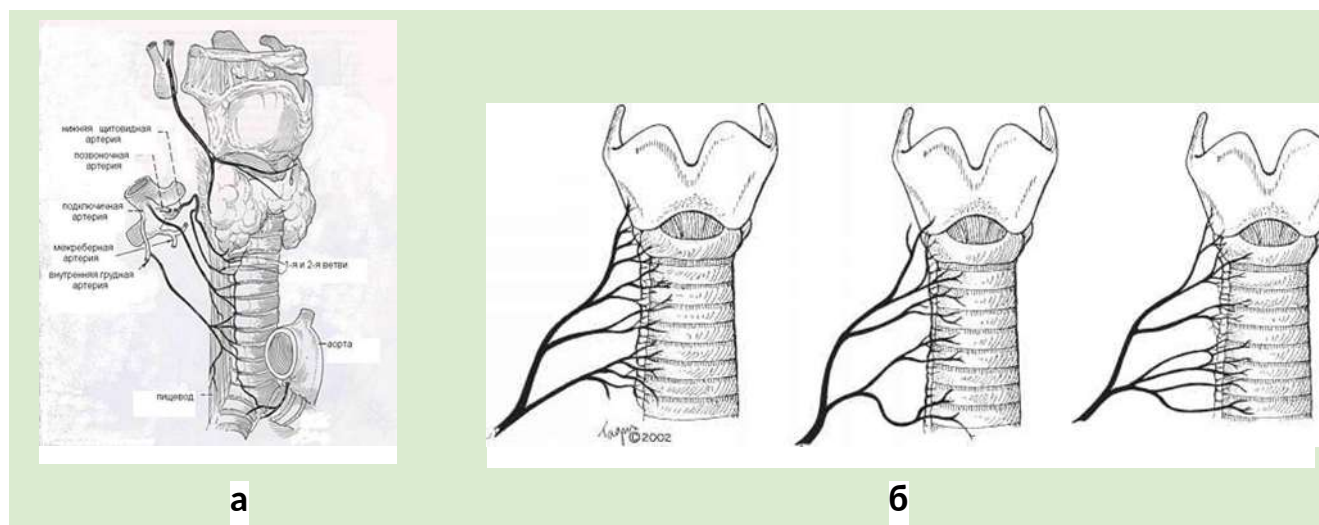
Хрящевые кольца трахеи представлены гиалиновой хрящевой тканью, богатой протеогликанами. Сложная микроархитектоника хрящевой ткани включает в себя межклеточное вещество (хрящевой матрикс) с залегающими в его глубине клетками хрящевой ткани (хондроцитами). Матрикс гиалинового хряща состоит преимущественно из коллагена II типа (однако присутствуют также и

коллагены IX, X, XI и других типов), погруженного в плотный гидратированный гель, образованный протеогликанами и структурными гликопротеинами, содержащими хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат и кератансульфат, связанными со стержневыми белками и нековалентно ассоциированными с длинными молекулами гиалуроновой кислоты. Хондроциты залегают в глубине хрящевого матрикса. На периферии гиалинового хряща молодые хондроциты имеют эллиптическую форму, а более глубоко расположенные клетки становятся круглыми и образуют изогенные группы численностью до восьми клеток.

Наличие плотного упругого межклеточного матрикса с глубоко залегающими отдельными группами клеток позволяет хрящевой ткани трахеи сохранять надлежащую эластичность и жесткость, необходимые для поддержания постоянного просвета трахеи при дыхании (Привес М., 2004; Netter F., 2008). Подробное изучение микроархитектоники и гистологического строения стенки трахеи крайне важно для понимания проблем, с которыми сталкивается тканевая инженерия при создании биологических конструкций данного органа.

Ткани трахеи кровоснабжаются преимущественно из верхних и нижних щитовидных артерий с превалирующей ролью последних, однако возможно наличие и дополнительных источников кровоснабжения от общих сонных и подключичных артерий, плечеголового ствола, дуги аорты, бронхиальных артерий (Сергиенко В., 2001, Дыдыкин С., 2006). Нижние щитовидные артерии участвуют в кровоснабжении наибольшей части трахеи, составляющей до двух третей органа, в то время как верхние щитовидные артерии могут питать лишь небольшой сегмент протяженностью от 2 до 5 колец (Salmeron J., 1998). Известен ряд вариаций ветвления нижней щитовидной артерии, встречающихся с различной частотой и подробно исследованных Т. Miura и J. Salassa во второй половине прошлого века. Установлено, что трахеопищеводные ветви, начинаясь от нижних щитовидных артерий, затем распадаются на трахеальные и пищеводные и, анастомозируя друг с другом, формируют так называемую латеральную сосудистую ножку. Последняя отдает мелкие ветви, проникающие через фиброзные связки между хрящевыми кольцами, кровоснабжающие слизистую

оболочку и анастомозирующие с артериями с противоположной стороны (Miura T., 1966; Salassa J., 1977). Венозный отток от глубокого подслизистого и поверхностного венозных сплетений трахеи осуществляется преимущественно в нижнее венозное сплетение щитовидной железы (Бисенков Н., 1953). Схематичная наглядная демонстрация системы кровоснабжения трахеи показана на Рисунке 1.2.



Примечание. (а) Кровоснабжение трахеи по J. Salassa, 1977; (б) вариации ветвления нижней щитовидной артерии по T. Miura, 1966

Рисунок 1.2. – Схематическое изображение кровоснабжения трахеи

Исследование кровоснабжения трахеи и особенностей хирургической анатомии нижних щитовидных артерий сыграло решающую роль в разработке трансплантаций органа в составе тиреотрахеального комплекса (Дыдыкин С., 2006).

1.2. Рубцовые стенозы трахеи. Современные подходы к лечению

Однако циркулярная резекция возможна только в случае, если патологические изменения затрагивают, по крайней мере, не более 50–75% длины органа. Как правило, безопасно хирургам удастся резецировать около 5–7 колец (Berg M., 2012)

Этапные реконструктивно-пластические операции (ЭРПО). ЭРПО с формированием просвета дыхательного пути на Т-образном стенте в течение нескольких месяцев представляются одним из вариантов паллиативного лечения, т. к. при этом сохраняется патологически измененная стенка трахеи.

ЭРПО показаны пациентам с мультифокальными и протяженными стенозами, распространяющимися на подскладочный отдел гортани с поражением голосовых складок или при протяженности стеноза более 60% длины органа.

Суть операции заключается в рассечении стенозированного участка трахеи и гортани, иссечения из ее просвета рубцовых тканей и формировании устойчивой трахео- или ларингостомы. После этого в просвет дыхательного пути вводится Т-образная трубка, на которой в течении 6–8 месяцев формируется просвет дыхательного пути. Данные операции возможны лишь в области шейного или шейно-верхнегрудного отделов трахеи. Однако, по данным наблюдения 118 пациентов в период 1963 по 2009 гг., эффективность ЭРПО в лечении рубцовых стенозов составила всего 29% (Черный С. 2011).

Трахеостомия. Операция, подразумевающая наложение искусственного дыхательного отверстия с выведением трахеостомической трубки. До настоящего времени не разработано общепринятого способа трахеостомии. Продолжают предлагаться все новые варианты этой операции. Перспективной, но не бесспорной становится методика чрескожной дилатационной трахеостомии с использованием современных материалов (Heurn L., 1999).

Однако в лечении рубцовых стенозов трахеи трахеостомия занимает место паллиативной операции. К ней прибегают в случае наличия некурабельного стеноза или в рамках подготовки пациента к радикальной операции для быстрого устранения дыхательной недостаточности. Кроме того, необходимо помнить, что сама трахеостомия является травмирующим агентом и, по данным многочисленных исследований, может быть причиной стенозирования дыхательного пути (Korber W., 1999).

Следует отметить, что радикальным методом лечения рубцовых стенозов трахеи на сегодняшний день можно считать только циркулярную резекцию трахеи.

В некоторых же случаях, при низко расположенных обширных стенозах или стенозах, охватывающих стенку трахеи на всем протяжении, не удастся выполнить даже паллиативную операцию. В отсутствии хирургического лечения, заболевание, как правило, заканчивается летальным исходом, вследствие прогрессирования процесса и нарастающей дыхательной недостаточности.

Таким образом, ни одна из вышеописанных методик не позволяет произвести радикальной операции при протяженных рубцовых стенозах трахеи, либо после развития несостоятельности трахеального анастомоза с возникновением большого диастаза между концами трахеи. Наложение пожизненной трахеостомы иногда является единственно возможным выходом для таких пациентов, однако это существенно снижает качество последующей жизни, несет в себе угрозу аррозионного кровотечения из крупных интраторакальных сосудов в любое время, даже спустя месяцы или годы.

Особое место в восстановлении протяженных дефектов трахеи занимают операции, связанные с использованием протезов, имплантатов и трансплантатов. Данные технологии будут рассмотрены подробнее в следующих разделах.

1.3. Роль и место имплантатов дыхательных путей в реконструкции критических дефектов трахеи

Критические дефекты трахеи, неспособные к заживлению без реконструкции, могут становиться следствием удаления ее части при хирургическом лечении различных заболеваний. Так, злокачественные опухолевые процессы нередко становились причиной обширных резекций органа (Cotton B., 1952, Abbott O., 1950; Jarvis F., 1950; Grillo H., 2005; Neville W., 1990; Давыдов М., 2006). Однако лидирующее место среди хирургических заболеваний трахеи в настоящее время принадлежит рубцовым стенозам. В последние годы их частота существенно возросла. Предположительно, это связано с увеличением количества тяжелых больных с черепно-мозговой и комбинированной травмой, нуждающихся в проведении реанимационных мероприятий, сопровождающихся ИВЛ, и с увеличением возможностей реанимационно-анестезиологического пособия, позволяющего возвращать к жизни крайне тяжелых пациентов.

Распространенность постинтубационных рубцовых стенозов трахеи по различным данным варьирует от 0,1 до 20% от общего числа больных, перенесших длительную интубацию. Посттрахеостомические стенозы, по данным некоторых авторов, возникают более чем в 50% случаев. При этом, как правило,

пациенты обращаются к врачу, когда диаметр просвета трахеи сужается более чем на 70%, и приходится диагностировать стеноз 2-3-й степени (Papla B., 2003).

Длительное сдавление мерцательного эпителия и его базального слоя из-за чрезмерного положительного давления в манжетке интубационной трубки может обуславливать развитие ишемии и возникновение некроза слизистой оболочки, что формирует входные ворота для инфицирования стенки дыхательного пути с последующим развитием интрамурального гнойно-некротического воспаления и некроза стенки трахеи. Некротизированные ткани в дальнейшем постепенно замещаются грубой соединительной тканью, деформирующей и сужающей дыхательный просвет с развитием рубцового стеноза. Так, рубцовые стенозы трахеи становятся распространенным осложнением ИВЛ (Середин Р., 2003).

В настоящее время при лечении рубцового стеноза трахеи достигнут значительный прогресс.

Выделяют следующие основные виды лечения:

- эндоскопическая реканализация трахеи (бужирование, дилатация, электрорассечение, лазерная вапоризация);
- стентирование трахеи;
- циркулярная резекция трахеи;
- пластика трахеи синтетическими трансплантатами;
- этапные реконструктивно-пластические операции (ЭРПО) с формированием просвета дыхательного пути на Т-образном стенте в течение нескольких месяцев;
- трахеостомия (паллиативная операция);
- *заместительные операции на трахее с использованием синтетических и биологических протезов;*
- *трансплантация трахеи от донора к реципиенту.*

Применение последних двух видов лечения (выделены курсивом) в настоящее время ограничивается отдельными клиническими случаями или клиническими исследованиями.

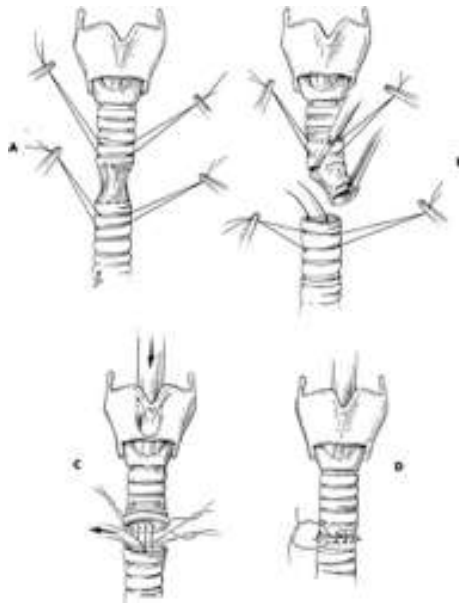
Бужирование. Суть метода заключается в дилатации стенозированного просвета трахеи тубусом ригидного бронхоскопа. Такая методика применяется как часть первичного лечения с последующим динамическим наблюдением за пациентом и подготовкой к стентированию или радикальной хирургической операции. Как самостоятельный метод лечения бужирование, как правило, не используется из-за высокой частоты рецидива заболевания. Кроме того, при выполнении данной процедуры высока вероятность повреждения стенки трахеи вплоть до ее разрыва.

Лазерная вапоризация. Выполняется под эндоскопическим контролем. Суть метода заключается в лазерной коагуляции и выпаривании фиброзной ткани в зоне рубцового стеноза. Заживление должно происходить за счет последующей эпителизации данной области. Для стабильного поддержания нормального просвета в течение длительного времени, требующегося для заживления, как правило, дополняется стентированием трахеи. Как и в случае с бужированием, достаточно часто требуются повторные операции, высока вероятность рецидива.

Стентирование трахеи. Стентирование подразумевает введение в трахею различных каркасных конструкций для поддержания ее просвета. На сегодняшний день существует огромное количество стентов, различающихся по диаметру, форме, материалу изготовления и способам фиксации к стенке трахеи. В последнее время в клинической практике начинают использоваться саморасширяющиеся стенты из нитиноловой сетки с полимерным покрытием (Sesterhenn A. et al., 2004; Yanagihara K. et al. 1997). Тем не менее, на сегодняшний день не существует ни однозначно установленных критериев выбора того или иного стента ни единого мнения о показаниях к их применению и сроках стентирования. Как правило, стентирование применяется в сочетании с другими методами лечения (лазерной реканализацией или бужированием трахеи) или в рамках подготовки пациента к радикальной операции. Как правило, стент остается в трахее в течение нескольких месяцев. За это время стентирование позволяет нивелировать или уменьшить последствия дыхательной недостаточности (если таковая имела у пациента), провести дообследование и

предоперационную подготовку. Затем следует контрольный период наблюдения за зоной стеноза после удаления стента. В некоторых случаях повторного стенозирования не происходит. Однако более характерно повторное стенозирование просвета дыхательного пути. В этих случаях ставится вопрос о рестентировании трахеи или выполнении открытых хирургических операций (циркулярной резекции или ЭРПО) (Мосин И., 2011; Татур А., 2008).

Циркулярная резекция трахеи. Циркулярная резекция трахеи (Рисунок 1.3) на сегодняшний день остается основным радикальным методом лечения рецидивирующих стенозов. Операция заключается в иссечении пораженного участка трахеи и наложении циркулярного межтрахеального или трахеогортанного анастомоза.



Примечание **A** – трахея взята на швы-держалки выше и ниже области стеноза (**B**) пораженная часть трахеи удаляется (**C, D**) наложение анастомоза по типу конец-в-конец

Рисунок 1.3. – Этапы операции циркулярной резекции трахеи

Лечение протяженных и мультифокальных стенозов все еще сталкивается с трудно преодолимыми проблемами. Кроме этого, как было обозначено ранее, крайне тяжелой категорией больных являются пациенты, которым уже была выполнена циркулярная резекция трахеи с восстановлением целостности дыхательного пути при помощи анастомоза с последующим развитием несостоятельности последнего. В этих случаях образуется обширный циркулярный дефект трахеи. Восстановление дыхательного пути за счет собственных тканей невозможно. Приходится прибегать различным трансплантатам. Синтетических протезов, удовлетворяющих требованиям клиницистов, в настоящее время нет.

Первые попытки использования синтетических материалов для протезирования трахеи были осуществлены Clagett еще в 1948 г. Пациенту была выполнена имплантация полиэтиленового стента в дефект трахеи. Пациент скончался через пять суток после операции вследствие нарастающей дыхательной недостаточности, вызванной нарушением эвакуации мокроты из

трахеобронхиального дерева, несмотря на трахеостомию, произведенную на третьи сутки для облегчения санации (Clagett O. et al., 1948).

С аналогичными осложнениями столкнулись и дальнейшие многочисленные попытки выполнить заместительную операцию на участке трахеи или главного бронха с использованием полиэтиленовых, стеклянных или стальных линейных протезов. Нарушение естественного дренирования мокроты, некротизирование стенки органа в области контакта с протезом, грануляционный стеноз и нарастающая дыхательная недостаточность вынуждали прибегнуть к трахеостомии и репротезированию в послеоперационном периоде. Практически во всех случаях вмешательства сопровождалось инфекционными осложнениями. Продолжительность жизни пациентов оставалась крайне невысокой. Большинство же из них умирали в первые пять суток после операции вследствие асфиксии (Abbott O., 1950; Craig R. et al. 1953; Keshinian J. et al., 1956).

Результатом дальнейших исследований данного направления во второй половине 20-го века стала разработка сетчатых протезов трахеи из стали или марлекса. Такие конструкции должны были обеспечивать лучшую совместимость за счет врастания собственных тканей пациента (Waterman D., 1956). Однако использование сетчатых материалов не обеспечивало восстановление слизистой оболочки в просвете трахеи и не решало проблему нарушенной эвакуации мокроты (Ellis P. et al., 1962; Pearson F. et al., 1968). Кроме того, нередкими становились осложнения в виде профузных аррозийных кровотечений из крупных интраторакальных сосудов. Так, по данным Deslauriers случаи кровотечения осложняли 4 из 7 имплантаций протезов из сетки Марлекс (Deslauriers J. et al., 1975).

Новый виток в разработке синтетических конструкций трахеи и бронхов был сделан с внедрением в клиническую практику трубчатых протезов из силикона. Силиконовые конструкции различной формы, предложенные Neville, имели лавсановые или дакроновые манжеты для эффективной и менее травматичной фиксации (Рисунок 1.4).

Несмотря на высокие риски несостоятельности анастомоза и сохраняющуюся проблему эвакуации мокроты, данные протезы обеспечивали более высокую продолжительность жизни, и результаты лечения расценивались клиницистами в целом как удовлетворительные. В отдельном случае, продолжительность жизни пациента, скончавшегося от дыхательной недостаточности, составила более 15 лет (Neville W. et al., 1972, 1990).



Рисунок 1.4. – Силиконовые протезы трахеи, предложенные W. Newille

Таким образом, пластика трахеи синтетическими трансплантатами, как правило, обеспечивает невысокую продолжительность жизни и из-за крайне высокого риска тяжелых осложнений (в виде резекции трансплантата, затяжных пневмоний, обтурации и рестеноза), на сегодняшний день, применяется только в исключительных случаях, когда во время оперативного вмешательства не представляется возможным восстановить целостность дыхательного пути или выполнить пациенту иную операцию (Паршин В., 2010). Все это вынуждает прибегать к трансплантации трахеи, в т. ч. биологическими конструкциями, созданными из собственных клеток пациента.

Первые шаги к созданию биологических протезов трахеи в эксперименте были сделаны в 1950-е годы. Замещение участка трахеи цилиндром, сформированным из кожного лоскута, выполненное Ф. Амировым, привело к гибели всех прооперированных животных вследствие стеноза протеза и обтурации просвета мокротой (Амиров Ф., 1956). Осознавая необходимость восполнения каркасной функции хрящевой ткани трахеи, предпринимались попытки создания полужестких конструкций из фрагментированных реберных

хрящей, помещенных в форму из стальной сетки и прекультивированных *in vivo* в футляре прямой мышцы живота. В дальнейшем конструкцией замещался участок шейного отдела трахеи животного. Несмотря на успешное формирование конструкции в гетеротопической позиции, после ортотопической имплантации у животных наблюдались признаки трахеомалиции и стеноза трахеи (Keshinian J. et al. 1956). Не увенчались успехом и последующие попытки использовать с такой целью конструкции на основе кожи, мышц шеи, стенки мочевого пузыря и консервированного перикарда: стеноз имплантата, нарушение естественного дренирования мокроты и инфекционные осложнения становились причиной гибели большинства животных (Greenberg S., 1960; Marshak G., 1973; Sabas A., 1977). Наибольших успехов в протезировании трахеи собственными тканями в эксперименте удалось добиться при имплантации в циркулярный дефект аутологичного участка аорты на эндостенте. Несмотря на то, что гистологические исследования эксплантов обнаружили эпителизацию внутреннего просвета протеза и даже признаки формирования хрящевых колец, удаление стента из просвета трахеи у большинства животных приводило к ее коллапсу и развитию дыхательной недостаточности (Martinod E. et al., 2003). Тем не менее, относительный успех данного эксперимента положил начало отдельным клиническим исследованиям с использованием тканей аорты. Так, уже в 2006 г. было выполнено восстановление циркулярного дефекта трахеи аутогенным фрагментом брюшной аорты. Пациент скончался через 6 месяцев в результате прогрессирующего грануляционного стеноза и затяжной пневмонии, осложнившейся септическим шоком (Azorin J., 2006).

Таким образом, несмотря на относительный успех, достигнутый при протезировании трахеи некоторыми тканями, такие конструкции не могут полноценно заместить функции и органа и не решают основных проблем, возникающих при пластике трахеи синтетическими протезами.

Трансплантация изолированной трахеи от донора к реципиенту является крайне рискованной операцией. Немногочисленные исследования свидетельствуют о высоком риске отторжения трансплантата и необходимости

проведения постоянной интенсивной иммуносупрессии, на фоне которой возрастает риск развития тяжелых инфекционных осложнений (Левашов Ю., 1991, 1998). Единственная в России успешная операция представляла собой трансплантацию трахеи в составе тиреотрахеального комплекса, обеспечивавшего эффективную реваскуляризацию трахеи с непосредственным восстановлением гемоциркуляции. Операция была произведена группой врачей, возглавляемой проф. В. Д. Паршиным. Продолжительность жизни пациента составила более 7 лет на фоне пожизненной иммуносупрессивной терапии (Parshin V., 2018). Однако такой метод лечения сам по себе имеет множество рисков и осложнений и назначается по жизненным показаниям, что значительно сдерживает применение данных операций в клинике.

Идея избежать пожизненной иммуносупрессии, а вместе с тем и сопровождающих ее осложнений, путем децеллюризации трахеи с полным или частичным удалением ее клеточной составляющей впервые была реализована на заре 21-го века. Трансплантация децеллюризированной трахеи двум пациенткам, оперированным по поводу аденокистозного рака трахеи, обеспечила продолжительность жизни около 1 и 1,5 лет соответственно при полном отказе от иммуносупрессии (Давыдов М., 2002). Несмотря на ставший уже характерным набор осложнений, сопровождавший операции (стенозирование трансплантата, нарушение эвакуации мокроты, рецидивирующие пневмонии), данное клиническое исследование внесло существенный вклад в развитие новой, наиболее прогрессивной технологии создания «неотрахеи» – тканевой инженерии органа.

1.4. Тканевая инженерия трахеи. Основные понятия. История создания тканеинженерных трансплантатов

Тканевая инженерия трахеи. Основные понятия. Тканевая инженерия (ТИ) — одна из новых перспективных биомедицинских технологий, позволяющих индуцировать регенерацию поврежденных тканей, замещать целые органы или их отдельные дефекты биологическими протезами, представляющая альтернативу существующим подходам к лечению. Основным преимуществом трансплантации

тканеинженерных органов или их частей перед любой другой трансплантацией является полное отсутствие необходимости иммуносупрессии в послеоперационном периоде и рисков отторжения трансплантата.

Термин «тканевая инженерия» был впервые использован в 1987 году на заседании, спонсируемом Национальным Научным Фондом, США (NSF, USA). Э. Атала (A. Atala), один из основоположников тканевой инженерии, предлагает такое определение: тканевая инженерия, основываясь на принципах трансплантации клеток, материаловедения и инженерных наук, имеет своей целью создание биологических заменителей, которые бы позволили восстановить и сохранить нормальную функцию организма.

ТИ любой ткани всегда требует наличия двух исходных компонентов — клеток-родоначальниц и биосовместимого материала, из которого изготавливается трехмерный каркас, называемый также матриксом-носителем или скаффолдом. Все процессы гисто- и морфогенеза протекают в его пределах. В идеале, материал для скаффолда по своим свойствам должен максимально соответствовать межклеточному веществу, это необходимо для создания в рамках скаффолда искусственной клеточной ниши — непосредственного окружения клеток, создающего адекватные условия для их пролиферации и/или направленной дифференцировки, а также для осуществления нормальных функций в дальнейшем, в том числе продукции межклеточного вещества.

Трахеальные тканеинженерные ткани были предметом исследований с 1990-х годов (J. Vacanti et al., 1994; Cull D. et al., 1990). Нарастающее число публикаций в настоящее время подтверждает актуальность этой проблемы.

Идеальная тканеинженерная конструкция трахеи должна максимально соответствовать и замещать функции полноценного органа, и иметь как соединительнотканную основу, аналогичную таковой в здоровой трахее человека, так и эпителиальную выстилку для адекватной работы мукоцилиарного клиренса. Поэтому матрикс-носитель можно заселять сразу несколькими типами клеток. Иллюстративным примером может служить тканеинженерная трахея, предложенная Jungebluth и соавт. в прошлом десятилетии. В данном случае

девитализированная трахея заселялась МСК КМ, полученными из гребня подвздошной кости, а ее внутренний просвет дополнительно колонизировался клетками назального эпителия. Принципиальная схема формирования ТИТ приведена на Рисунке 1.5.

В результате проведенного литературного анализа был выявлен ряд статей, в которых предполагалась возможность засева клеток различных типов на трупные материалы и девитализированные ткани в целях создания тканеинженерных трансплантатов трахеи, отдельные исследования будут рассмотрены более подробно в следующих подразделах. Однако, несмотря на успех некоторых доклинических исследований, данный подход не позволил решить проблему создания оптимального трансплантата дыхательных путей.

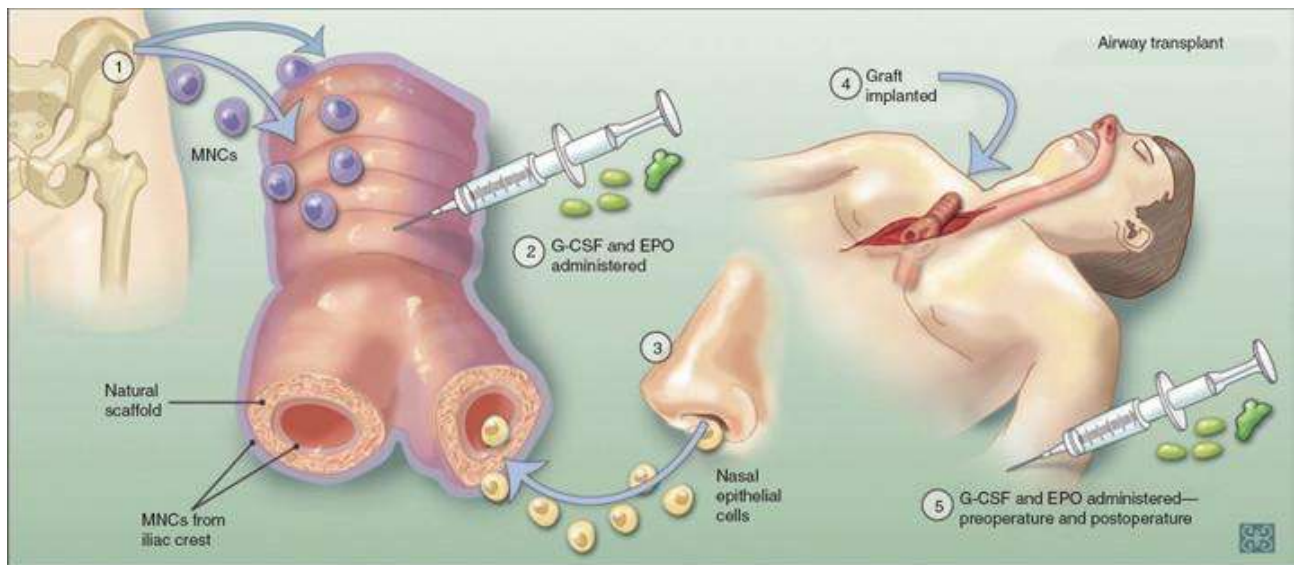


Рисунок 1.5. – Принципиальная схема формирования ТИТ человека: натуральный матрикс-носитель заселяется аутогенными клетками (МСК КМ и НЭК реципиента) (Jungebluth P., 2012)

Первую в России успешную трансплантацию искусственно выращенной трахеи выполнили группа врачей, возглавляемой В. Д. Паршиным, совместно с иностранными коллегами. Продолжительность жизни пациентки после операции составила более 8 лет.

Современные проблемы создания оптимальных тканеинженерных трансплантатов трахеи связаны с ограниченными возможностями клеточных ресурсов, недостаточной биосовместимостью материалов, из которых изготавливаются синтетические матриксы-носители, и несовершенством технологий децеллюляризации натуральных (кадаверных) тканей.

Создание матриксов-носителей для тканевой инженерии трахеи. Выбор клеточного носителя в тканевой инженерии дыхательных путей сегодня поставлен достаточно широко. Проводятся экспериментальные исследования на животных и *in vitro* с самыми различными материалами. Многие из них оказываются достаточно перспективными.

Все скаффолды, разработанные до настоящего времени, можно подразделить на резорбируемые и нерезорбируемые, в зависимости от взаимодействия материала, из которого они изготовлены, с тканями реципиента.

Как уже было представлено в предыдущих разделах, реконструкция трахеи синтетическими протезами была признана в большинстве случаев неэффективной и нецелесообразной еще в 1950-е – 1970-е годы. Тем не менее, в 1980-х – 1990-х годах в эксперименте на животных (собаках и кроликах) предпринимались попытки реконструкции трахеи простейшими биологическими конструкциями с использованием не резорбируемых скаффолдов на основе пористого политетрафлуорэтилена, силикона, и композитных материалов типа тефлоновой сетки. Данные работы оказались неудачными. Имплантация носителей из таких материалов приводила к очень большому числу тяжелых осложнений в виде разрастаний грануляционной ткани в зоне анастомоза, стенозированию и обструкции просвета трахеи (Cull D., 1990; Bottema J., 1986). В случае с использованием политетрафлуорэтиленовых скаффолдов (скаффолдом замещался резецированный пятисантиметровый сегмент трахеи) обструкция дыхательных путей развивалась у всех 9 прооперированных таким образом собак на сроке от 3 до 8 недель после операции. В то время как в контрольной группе животных, которым проводилось наложение циркулярного анастомоза без имплантации скаффолда, этого не наблюдалось. Кроме того, даже через 16 недель после имплантации морфологические исследования либо не выявляли на скаффолдах эпителиального роста, либо он оказывался крайне незначительным (Cull D., 1990). Последние данные могут свидетельствовать о том, что такие скаффолды не обеспечивают создания клеточной ниши на микроуровне, и, как следствие, отсутствуют адекватные условия для роста и пролиферации клеток.

Резорбируемые скаффолды способны метаболизироваться макрофагальной системой организма, со временем замещаясь межклеточным веществом, и не оставляют в организме реципиента постоянного инородного тела. Такие скаффолды могут быть получены путем специальной обработки кадаверных донорских органов или могут быть изготовлены искусственно из отдельных органических компонентов. В последнем случае они, как правило, изготавливаются на основе коллагена и/или гиалуроновой кислоты. Однако выбор коллагеновых скаффолдов является более предпочтительным, т. к. проведенные

экспериментальные работы показали, что нормальной адгезии эпителиальных клеток дыхательных путей к полностью гиалуроновым носителям не происходит (Ziegelaar W., 2002).

Наконец, в последнее время наиболее часто используются кадаверные аллотрансплантаты с последующей их децеллюризацией (удалением клеток) и последующей количественной контрольной оценкой остаточного ДНК в трансплантате (Lim M., 2013). Конечный продукт децеллюризации представлен бесклеточной основой, содержащей, коллагеновый матрикс, лишенный иммуногенных и аллергенных свойств. Такой матрикс-носитель является также биodeградируемым, т. е. в конечном итоге резорбируется и замещается новообразованным межклеточным матриксом (Berg M., 2014; Carbognani P., 1999; Gilpin A., 2017). Таким образом, децеллюляризация позволяет избежать попадания антигенов донора в организм реципиента и, как следствие, избежать нежелательной реакции иммунной системы.

Децеллюляризация – это технологический процесс, направленный на элиминацию клеток из нативной ткани с сохранением иерархической природы компонентов внеклеточного матрикса и трехмерной архитектоники органа или отдельной ткани (Parmaksiz M., 2016; Губарева Е., 2016; Кувда Е., 2017; Губарева Е. 2012; Hunziker, E., 2015). Элиминация клеток в современной тканевой инженерии обязательна при использовании донорских тканей для создания тканеинженерных конструкций, пригодных для трансплантации (Sutherland A., 2015).

Для проведения децеллюляризации используют различные физические и химические, в том числе ферментативные, способы (Chang C., 2014). Физическими способами являются: механическое воздействие, циклы замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком, использование сверхкритических флюидов. Химические способы можно разделить по классам применяемых агентов: ферменты (коллагеназы, трипсин, эндонуклеазы, экзонуклеазы) и детергенты (кислоты и щелочи, гипертонические и гипотонические растворы, ионные и неионные детергенты, хелатирующие агенты

и бимодальные детергенты). Выбор способа или их комбинация определяются структурой и свойствами целевого органа, т. к. необходимо сохранить структуру матрикса, достаточные механические и биологические свойства, не внести в состав цитотоксические агенты. Необходимо учитывать, что любой химический агент повреждает матрикс в той или иной степени, и речь идет только о минимизации последствий. Полученные таким образом каркасы способны сохранить адгезионные свойства, оставшиеся компоненты внеклеточного матрикса будут стимулировать пролиферацию и миграцию целевых клеток, а также последующее ремоделирование тканей реципиента (Kheir E., 2011; Tavassoli A., 2015).

Существуют определенные особенности децеллюляризации хрящей, связанные с природой данной ткани. Многочисленные исследования последних лет были посвящены проблеме ревитализации девитализированных хрящевых тканей (ДВХ) или децеллюризованных хрящевых тканей (ДЦХ). Хрящ представляет собой плотную соединительную ткань с низкой пористостью и отсутствием васкуляризации, что не позволяет применять методы децеллюляризации, связанные с использованием сосудистой сети для доставки химических агентов для элиминации клеток. Были разработаны различные протоколы децеллюляризации хрящевой ткани на основе детергент-энзиматического воздействия (Chang C., 2014; Tavassoli M., 2015, Yang Q., 2008; Nishiguchi M., 2002). Не все из них, однако, применимы для создания тканеинженерной конструкции трахеи с хрящевыми кольцами, т. к. включают этап получения крайне мелких фрагментов хряща для облегчения ферментативной обработки. Кроме того, исследования Sutherland показали, что агрессивная децеллюляризация неизбежно приводит к потере хрящевым матриксом его основной составляющей — гликозаминогликанов (Sutherland A., 2015). Для создания же тканеинженерной конструкции необходимы крупные фрагменты или целые рецеллюляризованные хрящи, позволяющие сохранить механические свойства самой конструкции и, таким образом, предотвратить ее стенозирование после имплантации.

Одной из новейших технологий обработки кадаверной хрящевой ткани для обеспечения более интенсивной децеллюляризации стало использование лазерной перфорации, предложенное Yong и соавт. в 2017 г. Авторами была применена грубая поверхностная перфорация ушного хряща кролика с формированием удаленных друг от друга рядов неглубоких слепых лунок, напоминающих широкие конусы. Из образованного таким образом матрикса затем формировалась цилиндрическая конструкция трахеи. Несмотря на качественный успех обработки ткани, достигнутый за счет более глубокого воздействия химических агентов, авторы ограничились экспериментальным исследованием с подкожной имплантацией ТИК лабораторным животным, что не позволяет оценить эффективность матрикса и ТИК при протезировании участка трахеи (Xu Y., 2017).

Клинические случаи применения ТИТ на основе децеллюризованных матриксов-носителей ограничиваются единичными наблюдениями. На сегодняшний день, в литературе описано применение с такой целью ТИК на основе кадаверной трахеи и отдельные попытки использования обработанных препаратов аорты. Но последняя методика не заслуживает отдельного внимания, т. к. данные исследования, в конечном счете, завершились неудачей из-за выраженного фиброзного стенозирования аортального аллотрансплантата в послеоперационном периоде (Carbognani P., 1999).

Таким образом, пересадка тканеинженерных конструкций на основе децеллюризованной трахеи является на сегодняшний день наиболее изученной. Носители из децеллюризованной ткани уже содержат соответствующие белки и факторы роста для достаточной адгезии, пролиферации и клеточной дифференцировки, что создает готовые условия клеточной ниши для колонизации собственными эндогенными клетками (Badylak S., 2011). Основным препятствием к их более широкому использованию, на сегодняшний день, являются: нерешенная проблема инфицирования органа из просвета трахеобронхиального дерева и развития фатальных гнойно-некротических осложнений, существующий дефицит донорских органов, а также сложности с качественной ревитализацией

(т. е. повторным заселением клеточным компонентом) глубоких слоев хрящевой ткани трахеи (Ziegelaar W., 2002).

Клеточные источники и ревитализация матриксов-носителей для тканевой инженерии трахеи. С целью создания тканеинженерной конструкции, девитализированный или децеллюризированный матрикс-носитель подвергается ревитализации или заселению клеточным компонентом, т. е. заселяется новыми прекультивированными клетками (при подготовке тканеинженерных конструкций для клинических исследований, как правило, используются собственные клетки реципиента). Ревитализация матрикса лежит в основе регенерации собственных тканей организма в зоне имплантации. Подсадка аутологичных (то есть собственных) клеток реципиента на матрикс дополнительно снижает его иммуногенность и повышает биосовместимость. С этой целью предварительно производится забор соответствующего фрагмента ткани у пациента, которому предстоит имплантация тканеинженерной конструкции. В условиях специализированной лаборатории из полученного образца выделяется необходимая клеточная культура. Клетки культивируются в специальных питательных ростовых средах. После получения необходимого количества клеток, они переносятся на соответствующий матрикс, и полученная ревитализированная конструкция имплантируется пациенту. При этом, ревитализация может осуществляться *in vitro* в рамках статической или динамической культуры (т. е. с использованием биореактора или без него) или *in vivo*, в зависимости от конкретного типа матрикса-носителя, его метрических параметров и клеточного компонента используемого для ревитализации. Так, например, в исследовании Jungebluth, приведенном выше, заселение тканей матрикса-носителя трахеи осуществлялась в ротационном биореакторе при непрерывном вращении матрикса в суспензии клеток.

В экспериментальном исследовании Kojima, выполненном позднее, предложен метод ревитализации непосредственно в теле реципиента при гетеротопической имплантации конструкции. Исследователи получали ТИК трахеи овцы на основе хондроцитов и фрагментов хряща носовой перегородки

или трахеи, путем прекультивирования *in vitro* на цилиндрическом стенте. ТИК имплантировались в область грудинно-соцевидной мышцы овцы для ревитализации на срок 8 недель. Авторами было показано, что данного временного промежутка оказывается достаточно для формирования новообразованной хрящевой ткани. Ревитализированная и васкуляризированная таким образом конструкция имплантировалась затем овце в ортотопическую позицию с резекцией участка трахеи. Постоянный просвет конструкции поддерживался силиконовым стентом. Несмотря на биосовместимость и наблюдаемую эпителизацию конструкции, патоморфологические исследования эксплантов через 4 недели после операции обнаруживали крайне низкое содержание хрящевой ткани. Недостатком данного исследования становились необходимость травматичного забора крупных фрагментов аутогенной хрящевой ткани, короткий период наблюдения за животным, а также неспособность ТИК поддерживать собственную форму самостоятельно (Kojima K. et al., 2014).

В большинстве случаев в качестве клеточного компонента для ревитализации носителя выступает только один тип клеток, например, мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Однако, как известно, МСК имеют ограниченный потенциал к дифференцировке. Такой имплантат еще не имеет мерцательного эпителия в своем просвете к моменту имплантации реципиенту, полное покрытие внутренней поверхности имплантата мерцательным эпителием с окончательным восстановлением мукоцилиарного клиренса может отмечаться через год после имплантации (Berg M., 2014; Gonfiotti A., 2011; Jungebluth, P., 2011.).

Было показано, что культивирование мерцательного эпителия *in vitro*, как правило, приводит к росту функционально неполноценных клеток. Они плохо секретируют муцин, склонны к дегенерации и даже полной потере ресничек (Jorissen M., 1991). Ряд авторов в конце прошлого столетия полагали невозможным полноценное исследование функции клеток мерцательного эпителия *in vitro* именно по этой причине (Trump B., 1980). Позже было показано, что культивирование таких клеток на скаффолдах, содержащих белки

естественного межклеточного матрикса (в т. ч. коллаген), с соблюдением условий двухфазной среды позволяет получить функционально полноценный мерцательный эпителий. Существующие методики предполагают также использование специального носителя для создания эффекта «клеточной ниши». Основной их сложностью является необходимость добиться функционального клеточного взаимодействия в рамках скаффолда (Go T., 2010).

Отдельные исследования показали возможность использования эпителиальных клеток, выделенных из слизистой оболочки трахеи или полости рта, для ревитализации трахеальных матриксов в комбинации с МСК, дифференцированными в хондроциты, или аутологичными моноклеарными клетками костного мозга (Jungebluth P., 2016; Ступина Т., 2012).

Основным недостатком МСК КМ является травматичный путь получения аутогенного субстрата для их выделения, предполагающий пункцию губчатой кости и сопровождающийся существенным риском кровотечения и локальных инфекционных осложнений, особенно опасных для полиморбидного пациента. Использование аутологичных эпителиальных тканей трахеи тоже имеет ограничения, связанные с основным заболеванием пациента – как правило, рубцовым стенозом трахеи, и, сопровождающими его метапластическими процессами в слизистой оболочке. Все это ставит под сомнение необходимость использования данных клеточных ресурсов при наличии более доступных источников, которые будут представлены далее.

Наряду с МСК все большую популярность набирает использование хондроцитов в качестве клеточного источника для ревитализации матриксов-носителей для тканевой инженерии хрящевых тканей. Хондроциты – основные специализированные клетки хрящевой ткани (большие клетки круглой, овальной или полигональной формы с отростками), которые являются производными хондробластов и единственной популяцией клеток в хрящевой ткани с локализацией в лакунах. Основная функция хондроцитов – это синтез и выделение компонентов межклеточного вещества, образующего аморфное вещество и волокнистые структуры хряща. Деятельность хондроцитов

увеличивает массу хряща изнутри (интерстициальный рост), что, совместно с хондробластами, позволяет регенерировать повреждённый хрящ (Oseni A., 2013; Novochadov V., 2014). Выделение и культивирование хондроцитов для тканевой инженерии хряща является сложной технической задачей, требующей развития новых воспроизводимых подходов для получения культур клеток, пригодных для рецеллюляризации при создании тканеинженерных конструкций.

В последние годы были предложены различные методы выделения хондроцитов из разных источников. Общими этапами всех протоколов изоляции (выделения) хондроцитов являются:

- ферментативная обработка с использованием коллагеназы 2-го типа;
- дополнительная или одновременная ферментативная обработка с трипсином, проназой, гиалуронидазой и др.

Также важным моментом в изоляции хондроцитов является продолжительность экспозиции ферментативных агентов, от которой зависят количество выделенных клеток и их фенотипическая характеристика.

Культивирование клеток в условиях *in vitro* направлено на экспансию для получения достаточного количества клеток для различных экспериментов, например, для заселения матриксов. При культивировании клетки многократно пересеваются (пассируются) и важно сохранить фенотипические характеристики, которые изменяются на поздних пассажах. Для характеристики культур хондроцитов применяют различные методы и маркеры, при этом специфическими маркерами являются коллаген 2-го типа и агрекан. Также наряду со специфическими маркерами предлагается определять возможную дедифференцировку и приобретение фибробластоподобного фенотипа по маркеру – коллаген 1-го типа.

Конкретные условия проведения *in vitro* культуральных работ с хондроцитами зависят от нескольких параметров: 1) определение доступного источника хондроцитов для трахеального хряща; 2) определение объема забираемого биоматериала – источника клеток для получения на ранних пассажах (до 10 пассажа) достаточного количества хондроцитов с подтверждением по

специфическим маркерам и отсутствием фибробластоподобного фенотипа; 3) определение состава полных питательных сред для культивирования хондроцитов с учетом происхождения донорского материала.

Источниками хондроцитов для получения культуры могут являться суставной хрящ, хрящевая часть перегородки носа и хрящ трахеи. Для дальнейшего аутологичного варианта клеточного компонента целесообразно использовать хрящевую часть перегородки носа как наименее травматичный источник клеток.

Объем забираемой хрящевой части носовой перегородки должен быть минимально достаточным для получения большого количества хондроцитов на ранних пассажах, а также не вызывать критических дефектов в месте забора. Особенностью питательных сред для хондроцитов человека является требование к отсутствию реагентов животного происхождения при производстве биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) в соответствии с Федеральным законом № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах», в то же время в доклинических исследованиях БМКП данное требование не является обязательным. На этапе доклинических исследований для удобства настоящей работы в состав питательных сред были включены реагенты животного происхождения, такие как фетальная бычья сыворотка и др.

Основным препятствием к более широкому использованию ДЦХ в ТИТ оставалась неспособность МСК и НХ к непосредственной миграции в толщу плотной хрящевой ткани. Таким образом, заселение ДВХ клетками приводит лишь к поверхностной колонизации матрикса (Lehmann, J., 2019).

Однако способность хондроцитов активно колонизировать имеющиеся поры матрикса-носителя и синтезировать межклеточное вещество была наглядно продемонстрирована на примере девитализированного суставного хряща в работах Cheng и соавт. (Cheng N. et al., 2011). В последующем Zhao, заселяя фрагменты децеллюризированного суставного хряща мезенхимальными стромальными клетками человека, показал, что увеличение пористости матрикса непосредственно улучшает качество его ревитализации (Zhao Y. et al., 2013). Хотя

механические свойства полученной им тканеинженерной хрящевой ткани по-прежнему уступали нативному хрящу, данное исследование внесло вклад в понимание необходимости искусственного создания дополнительных пор для объемного заселения клетками плотного хрящевого матрикса.

Систематизация основных подходов к ревитализации децеллюризованных и девитализированных хрящевых тканей приведена в Таблице 1.1.

Таблица 1.1. – Основные подходы к ревитализации матриксов-носителей хрящевой ткани

<i>Способы получения матриксов</i>	<i>Тип матрикса</i>	<i>Результаты</i>	<i>Ограничения</i>	<i>Ссылка</i>
Клеточные пеллеты/ агрегаты с включениями хряща	Частицы ДЦХ и ДВХ	ДЦХ более хондроиндуктивный, чем ДВХ и TGF-3 β для КМ МСК	Децеллюляризация уменьшала содержание гликозаминогликанов	Sutherland A. et al., 2015
Коллагеновый гель с включениями ДЦХ	Частицы ДЦХ	ДЦХ был хондроиндуктивным для СН МСК; ДЦХ с факторами роста был более хондроиндуктивным	Сжатие матрикса	Chang C. et al., 2014
Замороженный, высушенный, ДГХ, КДМ	ДЦХ микрофиламенты	КМ МСК продуцировали хрящевую матрицу в ДЦХ скаффолде; пористость увеличивала клеточную инфильтрацию	Модуль сжатия был меньше нативного хряща: 0.05 МПа	Zhao Y. et al., 2013
Замороженный, высушенный, УФ	Частицы ДЦХ	КМ МСК производили хрящевой матрикс после культивирования in vitro (до in vivo формирования кости в ПК импланте у крыс)	Децеллюляризация снижает содержание гликозаминогликанов	Gawlitta D. et al., 2014

Замороженный, высушенный	ДВХ фрагменты	ДВХ скаффолды отдельно были не очень хондроиндуктивны и способствовали небольшому синтезу матрикса для КМ МСК и Ж СТ; ДВХ скаффолд с добавлением факторов роста увеличивалась хондроиндуктивность и синтез нового матрикса.	Скаффолд сжался после культивирования	Diekman B. et al., 2009
Замороженный, высушенный	ДВХ фрагменты	Хондроциты гомогенно депонировали новый хрящевой матрикс внутри пор скаффолда ДВХ; хондроциты свиньи продуцировали новый хрящевой матрикс по периферии скаффолда	Агрегатный модуль обладал меньшими механическими свойствами, чем нативный хрящ	Cheng N. et al., 2011

Заключение по Главе 1

Хирургическое лечение постинтубационных стенозов и опухолевых поражений трахеи ограничивается возможностями реконструкции органа после резекции. Радикальные хирургические операции по типу циркулярной резекции пораженного участка органа имеют существенные ограничения по протяженности дефекта, а многоэтапные реконструктивные операции не предполагают радикального излечения пациента и имеют невысокую эффективность. Эндоскопическое стентирование трахеи также не позволяет решить радикально проблему поддержания постоянного просвета трахеи и часто сопряжено с осложнениями в виде прорастания сетчатой структуры стента рубцовыми тканями, образованием рестенозов или миграции стента. Протезирование трахеи синтетическими имплантатами имеет крайне низкую эффективность, подразумевает пожизненное присутствие инородного тела в дыхательных путях и имеет высокий риск послеоперационных осложнений, в т. ч. существенно

снижающих качество жизни пациента. Сама продолжительность жизни после таких операций остается невысокой.

Наиболее перспективным методом протезирования трахеи может стать замещение пораженного участка трахеи тканеинженерной конструкцией (ТИК). Однако оптимальной ТИК, удовлетворяющей требованиям клиницистов, на сегодняшний день нет, и клиническое использование тканеинженерных конструкций трахеи ограничивается единичными случаями и сопровождается множеством проблем. Основные сложности, возникающие на этапе создания ТИК, связаны с необходимостью ревитализации толстой и плотной трахеальной хрящевой ткани с сохранением ее оптимальных механических характеристик для поддержания постоянного просвета трахеи. В дальнейшем возникает необходимость обеспечения достаточного кровоснабжения ТИК после имплантации, создания условий для роста респираторного эпителия и препятствование размягчению трахеальной стенки.

Проведенный литературный обзор выявил, что оптимальным материалом для создания матриксов-носителей ТИК является децеллюляризированная кадаверная хрящевая ткань. Использование ревитализированных скаффолдов на основе кадаверных хрящевых тканей обладает рядом потенциальных неоспоримых преимуществ перед иными способами восстановления целостности трахеи после резекции, а в некоторых случаях может стать единственно возможным методом радикального лечения. Вместе с тем на данный момент отсутствуют общепризнанные эффективные подходы к функциональному дизайну ТИК трахеи. Предложенные ранее ТИК трахеи обладают рядом физиологических недостатков, связанных с биологической и физиологической совместимостью используемых материалов, их способностью формировать клеточную нишу для клеток реципиента, выбором параметров девитализации и ревитализации, наличие которых позволило сформулировать цель и задачи настоящей работы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования, общая характеристика материалов и методов исследования

Формирование естественной структуры тканей в рамках тканеинженерной конструкции в настоящем исследовании достигалось двумя основными способами (Схема 2.1):

- 1) заселение физиологически совместимого матрикса-носителя необходимыми пулами клеток;
- 2) обеспечение условий для колонизации матрикса-носителя клетками с преобразованием клеточной ниши.



Схема 2.1. – Формирование естественной структуры тканей в рамках тканеинженерной конструкции

Первый способ использовался для создания ТИТ кролика, а второй – для ТИК хрящевой ткани трахеи человека.

Решение поставленной задачи получения и исследования тканеинженерных конструкций трахеи осуществлялось по следующим направлениям:

- 1) создание готовых биорезорбируемых матриксов-носителей на основе децеллюляризированных тканей с требуемыми параметрами биологической и физиологической совместимости двух типов: на основе девитализированной трахеи кролика и девитализированной хрящевой ткани трахеи человека, подвергнутой лазерному травлению;

2) поиск и накопление оптимальных клеточных ресурсов для ревитализации матриксов-носителей;

3) разработка способов ревитализации матриксов-носителей обоих типов с использованием выбранных типов клеток.

Был сформирован следующий план (дизайн) исследования:

На основе анализа литературных данных и предварительных экспериментальных исследований были предложены:

- экспериментально-хирургическая модель критического дефекта трахеи для ортотопических имплантаций материалов;
- основные требования к матриксам-носителям для ТИТ и ТИК трахеи;
- оптимальные материалы для матриксов-носителей на основе литературных данных;
- требования к клеточным компонентам для ТИК трахеи;
- выбор оптимальных клеточных компонентов для ревитализации матриксов-носителей на основе литературных данных.

В рамках создания ТИК хрящевой ткани трахеи человека выполнено:

- 1) получение образцов кадаверной хрящевой ткани трахеи ($n = 18$);
- 2) получение образцов аллогенной хрящевой ткани перегородки носа ($n = 1$);
- 3) девитализация и лазерное травление хрящевой ткани трахеи ($n = 18$);
- 4) исследование цитотоксичности кадаверной хрящевой ткани, подвергнутой лазерному травлению ($n = 4$);
- 5) выделение и культивирование назальных хондроцитов;
- 6) исследование и характеристика клеточной популяции назальных хондроцитов;
- 7) гевитализация матрикса-носителя, создание ТИК хрящевой ткани трахеи человека ($n = 8$);
- 8) контроль качества ревитализации;
- 9) гетеротопические ($n = 5$) и ортотопические ($n = 8$) имплантации ТИК хрящевой ткани трахеи человека;

10) исследования и оценка физиологической и биологической совместимости и эффективности ТИК.

В рамках создания ТИТ кролика выполнено:

- получение образцов сингенной трахеи кролика ($n = 3$);
- выделение и культивирование сингенных МСК КМ;
- выделение и культивирование сингенных КЛЭ;
- исследование и характеристика клеточных популяций МСК КМ и КЛЭ кролика;
- девитализация образцов трахеи кролика ($n = 3$);
- ревитализация матрикса-носителя, создание ТИТ кролика ($n = 3$);
- контроль качества ревитализации матрикса-носителя;
- ортотопические имплантации ТИТ ($n = 3$);
- исследования и оценка физиологической и биологической совместимости и эффективности ТИТ.

Материалом для исследования служили образцы трахеи кролика ($n = 3$) и образцы хрящевой ткани человека ($n = 18$). Все образцы трахеи кролика в ходе исследования подвергались девитализации, ревитализации и имплантации в ортотопическую позицию. Основные этапы работы с образцами трахеи кролика представлены в линейной последовательности на схеме 2.2.

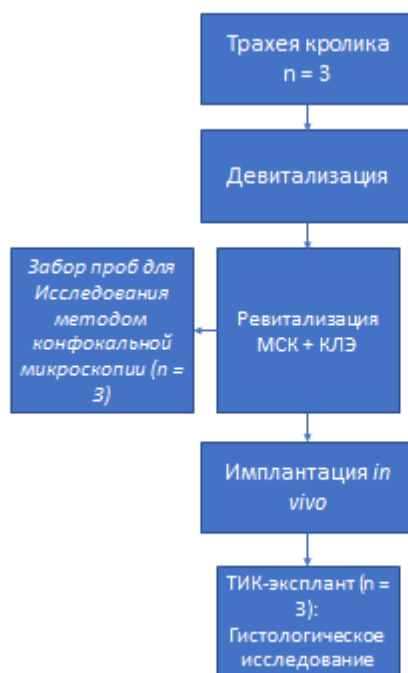


Схема 2.2 – Обработка образцов трахеи кролика в рамках экспериментального исследования

Образцы хрящевой ткани трахеи (ХТ) человека сортировались случайным образом на подгруппы после выполнения девитализации, лазерного травления (лазерной перфорации) и оценки цитотоксичности. В дальнейшем, часть образцов ($n = 8$) подвергалась ревитализации (заселению клеточным компонентом), другая часть сохранялась интактной для исходных гистологических исследований и Микро-КТ ($n = 4$) и имплантации животным контрольной группы ($n = 4$). Разделение образцов хрящевой ткани трахеи человека на подгруппы и основные этапы работы в рамках экспериментального исследования создания ТИК хрящевой ткани трахеи человека приведены на Схеме 2.3.

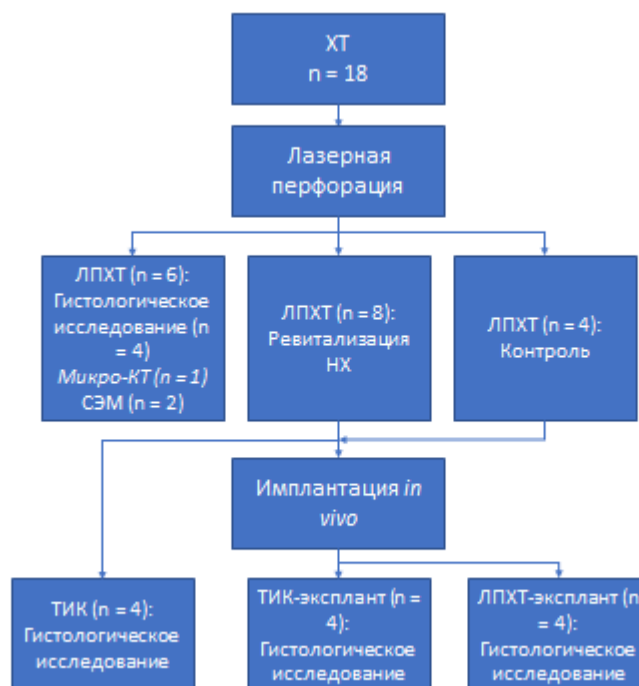


Схема 2.3 – Распределение и обработка образцов хряща трахеи (ХТ) человека в рамках экспериментального исследования

Каждый из этапов работы будет рассмотрен подробно в дальнейших разделах главы «Материалы и методы».

Согласно дизайну исследования, экспериментальная хирургическая работа выполнялась на линейных гипоимунных бестимусных мышах ($n = 3$), служивших моделью для гетеротопической имплантации образцов, и кроликах породы «Серый великан» ($n = 11$), служивших моделью для ортотопической имплантации ТИК и матриксов-носителей.

В ходе исследования биосовместимости ТИК и матриксов-носителей хрящевой ткани трахеи человека каждой из трех мышей были выполнены имплантации готовых ТИК: первой мыши имплантирована одна ТИК, второй и третьей мыши – по две. Дополнительно, каждому животному имплантированы образцы контрольной группы: первой мыши т. н. «негативный» контроль – образец нативной неперфорированной хрящевой ткани, заселенной назальными хондроцитами (НХ), второй и третьей – по два образца неревитализированной ЛПХТ.

Все кролики случайным образом были разделены на три группы. Животным первой группы ($n = 3$) были выполнены ортотопические имплантации ТИК на основе девитализированной трахеи кролика, МСК КМ кролика и КЛЭ кролика в рамках исследования безопасности и эффективности данной конструкции. Животным второй группы ($n = 4$) выполнялись ортотопические имплантации ТИК на основе хрящевой ткани трахеи человека и НХ кролика. Животные третьей (контрольной) группы ($n = 4$) получили матриксы-носители (ЛПХТ), незаселенные клеточным компонентом. Распределение животных по группам наглядно отражено на Схеме 2.4.

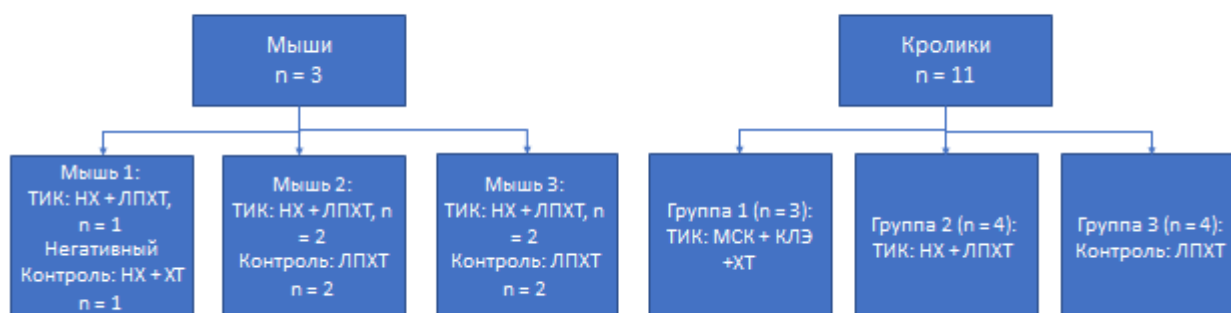


Схема 2.4. – Распределение животных по группам в рамках экспериментального исследования, в зависимости от типа имплантированного материала

Таким образом, при гетеротопической имплантации каждому животному (мышь) имплантировалось от 2 до 4 образцов одновременно. Ортотопическая имплантация подразумевала имплантацию одного образца определенного типа непосредственно в дефект трахеи каждому животному (кролику).

Технология выполнения имплантаций, а также методы работы с животными будут приведены подробно в следующих разделах данной главы.

2.2. Биологические материалы, использованные для изготовления матриксов-носителей

Биологические материалы, использованные для изготовления матриксов-носителей на основе тканей трахеи кролика. В качестве исходного

материала для получения бесклеточного матрикса-носителя применяли образцы ($n = 3$) нативной трахеи кроликов-доноров ($n = 3$) одной линии породы «Серый великан», выделенные на протяжении от второго кольца трахеи до бифуркации.

Биологические материалы, использованные для изготовления матриксов-носителей на основе хрящевых тканей трахеи человека. В качестве доноров хрящевой ткани человека для получения матриксов-носителей в ходе настоящего исследования использовались исключительно кадаверные доноры, отвечающие следующим критериям включения:

1) подписанная форма информированного согласия на посмертное использование тканей в научно-исследовательских целях на момент смерти;

2) возраст от 18 до 65 лет на момент смерти. В качестве нативного материала для получения бесклеточного матрикса-носителя использовались фрагменты хряща, выделенного из участка трахеи ($n = 1$) трупного донора от перстневидного хряща до карины и очищенного от окружающих тканей (Рисунок 2.1.).



Рисунок 2.1 – Образец кадаверной трахеи человека перед проведением девитализации. Фотография

Получение биологического материала человека в рамках настоящего исследования производилось на основании одобрения Локального комитета по этике ФГБУ ВО Первый МГМУ им И. М. Сеченова (Протокол № 07-15 от 15.07.2015).

2.3. Девитализация биологических материалов для получения бесклеточных матриксов

Наиболее простым и эффективным методом получения матрикса-носителя, не содержащего живых клеток донора, но с сохранной архитектоникой и структурой исходной нативной ткани, является девитализация. Под девитализацией понимают целенаправленное уничтожение живых клеток в ткани при сохранении в материале клеточного содержимого и межклеточного матрикса.

Перед проведением девитализации образцы нативных тканей промывали буфером PBS для удаления сгустков крови. Затем образцы помещали в пробирку с буфером PBS и замораживали в течение 15 мин в жидком азоте. После заморозки, образцы размораживали в водяной бане при +37 °C в течение 30 мин, проводили замену буфера PBS и затем дважды повторяли циклы замораживания-оттаивания.

2.4. Модификация структуры бесклеточных матриксов на основе хрящевой ткани трахеи человека на уровне микроархитектоники

Целью модификации структуры матриксов на уровне микроархитектоники является непосредственное формирование путей для клеточной миграции в глубокие слои готового матрикса-носителя при последующей ревитализации. Модификация структуры девитализированной кадаверной хрящевой ткани человека на уровне микроархитектоники осуществлялась методом лазерного травления с формированием идентичных слепых лунок заданных метрических параметров.

Девитализацию кадаверных тканей трахеи человека проводили в соответствии с протоколом, описанным в параграфе 2.3. Перед выполнением лазерного травления девитализированная хрящевая ткань трахеи человека разделялась на фрагменты размерами 5 мм × 5 мм × 1 мм. Лазерное травление осуществляли посредством кратковременного (импульсного) воздействия лазерного излучения CO₂-лазера со стандартной длиной волны 10.6 мкм и длительностью импульса 0,2 мс с формированием слепой лунки на поверхности готового матрикса-носителя в результате каждого импульса. В результате процедуры лазерного травления лунками покрывали до 90±10% поверхности

матрикса. Принципиальная схема процесса лазерного травления приведена на Рисунке 2.2.

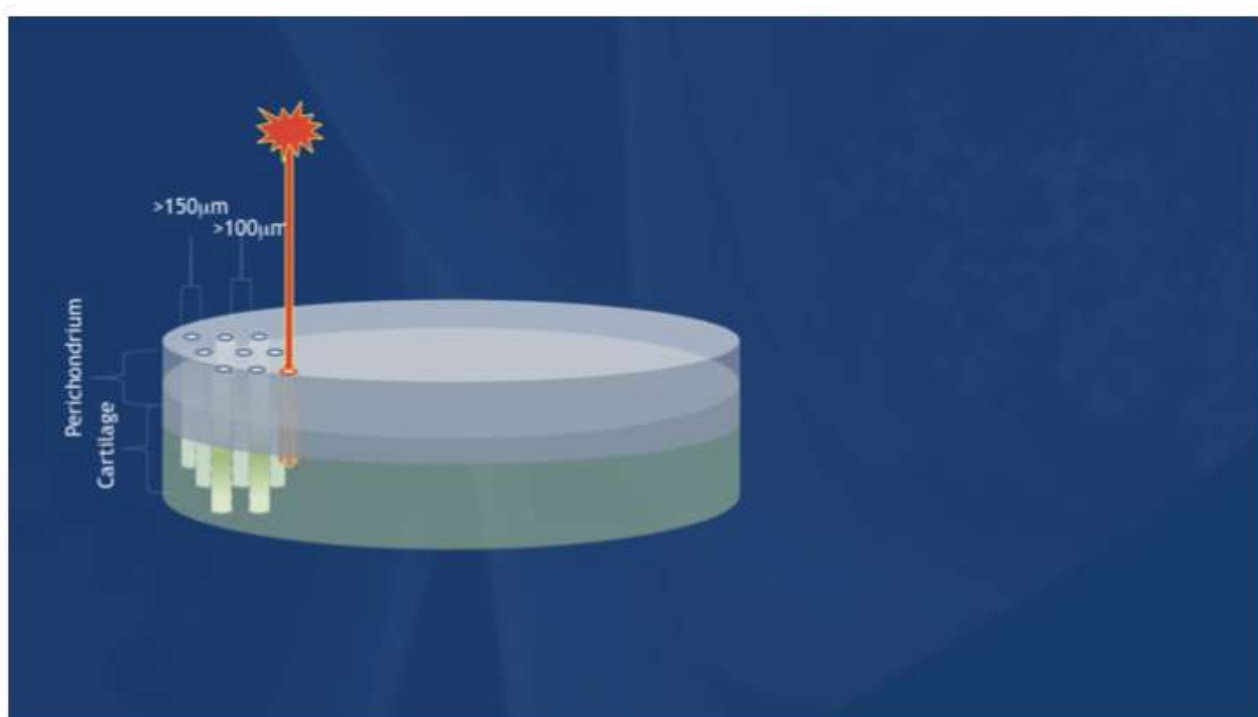


Рисунок 2.2. – Схематичное изображение процесса лазерного травления пластинки хрящевой ткани трахеи человека, покрытой перихондриумом

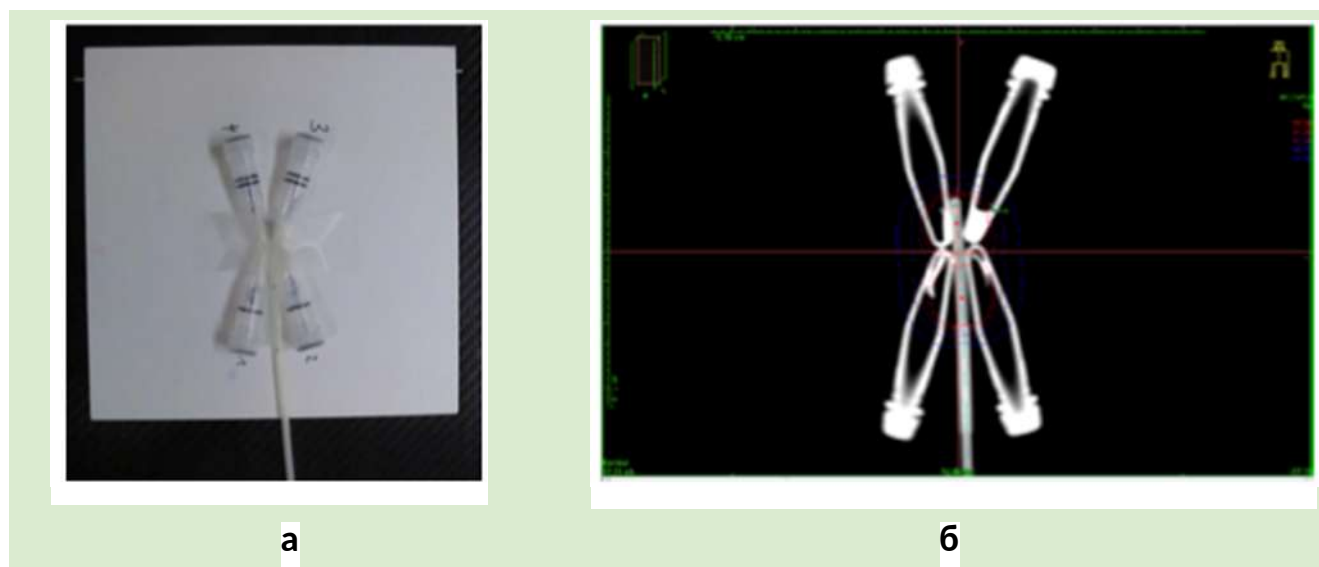
2.5. Стерилизация готовых матриксов носителей

Стерилизация готовых матриксов носителей выполнялась с помощью облучения образцов бета- и гамма-излучением от изотопов иридия (^{192}Ir).

Доза поглощенного ионизирующего излучения для каждого из образцов составила не менее 1300 Гр. Иридий 192 является радиоактивным изотопом с периодом полураспада 73,8 суток. Иридий 192 испускает бета- и гамма-излучение с максимальной энергией 670 кэВ и максимальной энергией фотонов 1,06 кэВ. Источник иридия является частью системы, используемой в отделении радиационной онкологии в Университетской клинике Базеля для брахитерапии. В таких системах источник излучения находится внутри радиационно-защищенной капсулы и с помощью аппликатора может перемещаться в требуемое положение. Положение источника излучения при облучении образцов рассчитывалось с

помощью системы планирования (Ocentra Brachy Version 4.5.2, Nucletron B.V., Нидерланды) для обеспечения оптимального распределения поглощенной дозы.

Образцы готовых матриц-носителей помещали в отдельные пластиковые пробирки (Eppendorf, Германия). Расположение образцов в пластиковых пробирках контролировалось с помощью компьютерной томографии (КТ) (SOMATOM Syngo CT, Siemens, Германия), которая была также необходима для расчета поглощенной дозы. На Рисунке 2.3а показана установка с четырьмя пластиковыми пробирками, расположенными вокруг аппликатора. Рисунок 2.3б представляет собой КТ-изображение установки. Красные точки – это точки задержки источника Иридия. Кроме того, на рисунке показаны линии изодозы, фиолетовая линия обозначает линию изодозы соответствующую 65 Гр. Следовательно, облучение пришлось провести 20 раз, чтобы получить поглощенную дозу в 1300 Гр.



Примечание. (а) Положение пробирок с образцами относительно аппликатора; (б) КТ-изображение, красные точки – точки задержки источника Иридия. Фиолетовая линия – линия изодозы соответствующая 65 Гр.

Рисунок 2.3. – Стерилизация матриксов-носителей облучением под контролем КТ

2.6. Оценка цитотоксичности матриксов-носителей

Оценку цитотоксичности всех матриксов-носителей перед ревитализацией клеточным ресурсом проводили экстракционным методом на культуре МСК КМ кролика. Экстракты ДТМ кролика получали следующим способом: образцы ДТМ кролика с площадью поверхности 3 см² помещали в 1 мл питательной среды для МСК КМ и инкубировали в течение 72 ч при +37 °С. МСК КМ четвертого пассажа засевали в 96-луночный планшет в концентрации 5×10³ клеток/лунка и культивировали в условиях CO₂-инкубатора. Подсчет клеток проводили на автоматическом приборе подсчета клеток Countess II FL Automated Cell Counter. Через 24 ч к клеткам добавляли полученные экстракты ДТМ, раститровывая экстракт шесть раз методом последовательных разведений (n = 3) в питательной среде для МСК КМ, и культивировали в течение 48 ч.

Оценку цитотоксичности экстрактов ДТМ проводили методом оценки метаболической активности клеток с применением реагента PrestoBlue. Для проведения теста на цитотоксичность, после 48 ч культивирования проводили смену питательной среды на 90 мкл/лунка HBSS с Ca²⁺ и Mg²⁺с добавлением

реагента 10 мкл/лунка PrestoBlue и инкубировали в течение 30 мин в условиях CO₂-инкубатора. Затем, для остановки реакции, добавляли раствор SDS до финальной концентрации в лунке 1%. Измерение поглощения проводили при длине волны 540 нм с референсом 630 нм на планшетном фотометре Multiskan FC. В качестве контроля использовали МСК КМ в питательной среде без добавок экстракта (n = 3). Фоновое значение учитывали добавлением реагента в HBSS с Ca²⁺ и Mg²⁺ (n = 3). Оценку цитотоксичности всех матриксов-носителей на основе кадаверной хрящевой ткани трахеи человека дополняли количественными измерениями эндотоксина в образцах кондиционированной среды с помощью жидкостной хроматографии.

2.7. Морфологические и аналитические методы исследования

2.7.1. Гистологическое исследование и световая микроскопия

Гистологическое исследование всех образцов нативных тканей, матриксов-носителей и готовых тканеинженерных конструкций выполнялось после предварительного выдерживания образцов в растворе формальдегида 4% в течение 4 часов и парафинизации по стандартному протоколу. Для гистологического исследования образцов с парафиновых блоков получали срезы толщиной 5 мкм с использованием микротомов (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы помещали на непокрытые предметные стекла. Затем срезы адгезировали при +56 °С в течение 30 мин. Полученные срезы депарафинизировали, окрашивали гематоксилином и эозином или гематоксилином и Сафранином-О по стандартным протоколам, дегидратировали и просветляли в ксилоле. Срезы заключали под покровные стекла в синтетической монтирующей среде. Микроскопия и цифровые микрофотографии для морфологического исследования выполнялись с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse L200 (Nikon, Япония) и автоматической установки Pannoramic DESK.

Гистологические исследования выполняли на базе Института хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля и Отдела передовых клеточных технологий Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

2.7.2. Иммунофлуоресцентное окрашивание

С целью дополнительной оценки эпителизации ТИК на основе тканей трахеи кролика, срезы, полученные с парафиновых блоков и покрытые поли-L-лизинном подготавливали к иммунофлуоресцентному окрашиванию. Для этого проводили депарафинизацию, а затем демаскировку антигена в Tris-EDTA (pH 10.0) буфере в микроволновой печи при мощности 100 Вт в течение 10 минут, затем стекла охлаждали до комнатной температуры и отмывали в PBS. Проводили блокировку неспецифического связывания антител раствором 2%-го BSA в PBS-T в течение 20 мин при +25 °С. Раствор удаляли и наносили первичные моноклональные антитела anti-CDH1, anti-CKPan, anti-Ki67 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA), в растворе 2%-го BSA в PBS-T и инкубировали в течение 12 ч при +4 °С. Затем срезы трижды отмывали в PBS по 5 мин, и наносили вторичные поликлональные антитела конъюгированные с биотином к первичным антителам CDH, CKPan разведённые в PBS-T с добавлением 2% BSA. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +3 °С. Клетки снова отмывали PBS трижды по 5 мин и наносили в PBS-T с добавлением 2% BSA: стрептавидин-Alexa Fluor 488 ко вторичным поликлональным антителам, конъюгированные с биотином; вторичные поликлональным антителам Alexa Fluor 594 к первичным антителам Ki67. В качестве отрицательного контроля использовали срезы без добавления первичных антител. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +32 °С. Срезы отмывали PBS трижды по 5 мин. Ядра окрашивали Hoechst-33342 в концентрации 1 мкг/мл. Препараты заключали под покровное стекло в 80%-м глицерине в PBS. Микроскопию проводили при помощи флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TE-2000.

2.7.3. Конфокальная микроскопия

Для определения жизнеспособности клеток, заселенных на поверхность матриц-носителей на основе тканей трахеи кролика, проводили конфокальную микроскопию с окраской клеток флуоресцентными красителями по методу Live/

Dead. Для этого заселенные клетки окрашивали в инкубаторе растворами кальцеина-АМ и этидиума гомодимера в течение 20 мин в полнокомпонентной питательной среде. Визуализацию проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 710 с объективом Plan-Apochromat 10x/0.45 M27.

2.7.4. Сканирующая электронная микроскопия

Для исследования поверхности матриксов-носителей на основе хрящевых тканей, подвергнутых лазерному травлению, применялась сканирующая электронная микроскопия с напылением золота (Nova NanoSEM 230, FEI, США). В качестве контроля использовался образец нативной девитализированной хрящевой ткани трахеи человека, не подвергнутый лазерному травлению. Сканирующую электронную микроскопию выполняли на базе Института хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля.

2.8. Получение и накопление клеточных ресурсов для ревитализации матриксов-носителей

2.8.1. Получение и культивирование мезенхимальных стромальных клеток костного мозга кролика

Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ) кролика получали в соответствии с протоколом, применяемым в ЦКП «Регенеративная медицина» Сеченовского Университета. Сингенные МСК кролика выделяли из костного мозга, который получали путем перфузии бедренной кости. Аспират костного мозга помещали в стерильную пробирку, содержащую 50 ЕД/мл гепарина и 0,25 мг/л гентамицина в PBS, и доставляли в лабораторию при температуре +20–24 °С. Выделение клеток и работу с ними проводили в чистой зоне 5-го класса по ISO. Аспират костного мозга объемом 10 мл был помещён в центрифужную пробирку и осаждён при 350 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в 20 мл лизирующего буфера (114 mM NH₄Cl, 7,5 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA) в течение 3–5 мин. Затем повторно центрифугировали, клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде для

культивирования МСК КМ на основе питательной среды DMEM/F12 (Invitrogen, США), содержащей 10%-й FBS (Invitrogen, США), 0,4 мкМ инсулина, 20 нг/мл bFGF, 10 нМ дексаметазона, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Суспензию клеток высевали в количестве $1,0\text{--}1,5 \times 10^6$ кл/мл в культуральные флаконы и помещали в CO₂-инкубатор с концентрацией CO₂ 5%, атмосферного воздуха 95% при температуре +37 °С и с повышенной влажностью. Замену культуральной среды производили каждые 72 ч. При достижении 90%-й конфлюэнтности клетки отмывали раствором DPBS без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, затем снимали с культурального пластика раствором TrypLe (Invitrogen, США), центрифугировали при 350g в течение 5 мин, отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в питательной среде и помещали 1/3 клеточной суспензии на новую культуральную посуду.

2.8.2. Получение и культивирование мерцательного эпителия кролика

Сингенные эпителиальные клетки выделяли из нативного легкого кролика. Легкое отмывали от компонентов крови методом длительной перфузии малого круга кровообращения физиологическим раствором с непрерывной подачей последнего в правый желудочек сердца кролика-донора с помощью роликового насоса. Очищенная ткань легкого освещалась, приобретая белую окраску. Легкое мобилизовалось, отделялось от окружающих тканей и, после пересечения магистральных сосудов, помещалось в контейнер с транспортной средой, состоящей из DMEM/F12 с добавлением 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и доставлялось в лабораторию при температуре +20÷24 °С. В условиях чистой зоны легкое измельчали на кусочки объема 4 ± 2 мм³ и обрабатывали раствором диспазы в концентрации 5 ЕД/мл на протяжении 45 мин при +37 °С. Полученную суспензию фильтровали через сито 70 мкм для отделения фрагментов легочной ткани от клеточной взвеси. Фильтрат центрифугировали при 1200 об/мин и ресуспендировали осадок полной питательной средой KSFM (Invitrogen, США) с саплементом Keratinocytes Supplements (Invitrogen, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл

стрептомицина (Invitrogen, США). Полученную суспензию высевали на дно 24-луночного культурального планшета, предварительного покрытого коллагеном I типа. Культивирование клеток проводили в условиях CO₂-инкубатора с заменой культуральной среды каждые 72 ч (Рисунок 2.4).

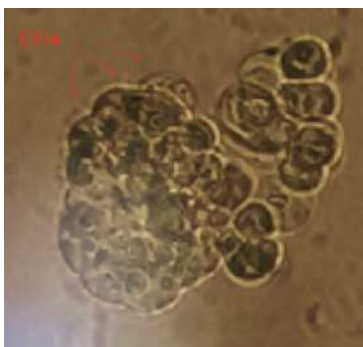


Рисунок 2.4. — Колония сингенных клеток легочного эпителия кролика в первичной культуре. Красными стрелками обозначены реснички на поверхности клеток мерцательного эпителия. Световая микроскопия, увеличение $\times 100$

2.8.3. Оценка фенотипа мезенхимальных стромальных клеток костного мозга кролика и мерцательного эпителия легких кролика

Получение культур МСК КМ и эпителия трахеи кролика подтверждали с помощью иммунофлюоресцентного анализа с использованием антител: CD90, CD271, CDH, SOX2, COL1, Vimentin для МСК КМ и CK8/18, CK14, CKPan для эпителия соответственно. Для этого МСК КМ первого пассажа и эпителий трахеи нулевого пассажа трижды отмывали в PBS и фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида в PBS (pH 7,4) в течение 10 мин при 25 °С. Далее клетки трижды отмывали в PBS с 0,05% Tween 20 (PBS-T) по 5 мин, пермеабилizировали с помощью метанола при минус 20 °С и блокировали неспецифическое связывание антител раствором 2% BSA в PBS-T в течение 20 мин при +25 °С. Раствор удаляли и наносили первичные моноклональные антитела в разведении 1:100 anti-CDH, anti-COL2, anti-CD90, anti-SOX2, anti-Vimentin, для культуры МСК, и anti-CK8/18, anti-CK14, anti-CKPan, для культуры эпителиальных клеток трахеи, в растворе 2% BSA в PBS-T и инкубировали в течение 12 ч при +4 °С. Затем клетки трижды отмывали в PBS по 5 мин, и наносили вторичные поликлональные антитела в разведении 1 : 500 конъюгированные с биотином к

первичным антителам CD90, CD271, SOX2, CKPan разведённые в PBS-T с добавлением 2% BSA. Инкубацию проводили в течение 60 мин при +25 °C. Клетки снова отмывали PBS трижды по 5 мин и наносили в PBS-T с добавлением 2% BSA: стрептавидин-Alexa Fluor 488 ко вторичным поликлональным антителам конъюгированным с биотином; вторичные поликлональные антитела Alexa Fluor 594 к первичным антителам CDH, Vimentin и биотинилированные антитела к CD90, CD271, SOX2, CKPan, CK-8/18, CK-14. В качестве отрицательного контроля вторичных антител к исследуемым культурам не добавляли первичные антитела. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +25 °C в темноте. Клетки отмывали PBS трижды по 5 мин. Ядра окрашивали Hoechst-33342 в концентрации 1 мкг/мл.

2.8.4. Выделение, культивирование и оценка фенотипа назальных хондроцитов человека

Для получения данного клеточного компонента в настоящем исследовании использовалась хрящевая часть перегородки носа как наименее травматичный источник клеток. Материал для клеточной изоляции выделялся биопсийными щипцами в виде отдельных проб из хрящевой ткани резецированной в рамках выполнения ринопластики у пациентов, давших предварительное согласие на использование тканей для научных исследований.

Протокол выделения назальных хондроцитов из биопсии перегородки носа включает следующие процедуры:

1. Полученный хрящ назосептальной перегородки проверяли на возможные загрязнения в условиях ламинарного шкафа.
2. Проверенный хрящ подвергали ферментации: переносили в пробирку объемом 50 мл., добавляли Collagenase Type II 0,15% и помещали в инкубатор на 22 часа при температуре +37 °C с 5%-м CO₂.
3. После ферментированный хрящ фильтровали с помощью стерильного сетчатого фильтра на 100 мкм в пробирку на 50 мл, затем нейтрализовывали и центрифугировали в течение 4 минут при 1300 об/мин.

4. Засеивали в культуральную посуду клеточную суспензию хондроцитов. и культивировали клетки в течение 21 дня при 37 °С 5% CO₂, меняя среду каждый третий день. С целью накопления количества живых клеток, достаточного для витализации матриксов-носителей выполнялось культивирование назальных хондроцитов до достижения второго пассажа (Рисунок 2.6).

5. Для иммуноцитохимического анализа проводили окрашивание типами коллагена I и II с использованием специфических хрящевых антител, окрашивание клеток живых/мертвых и иммуногистохимическое клеточное типирование.

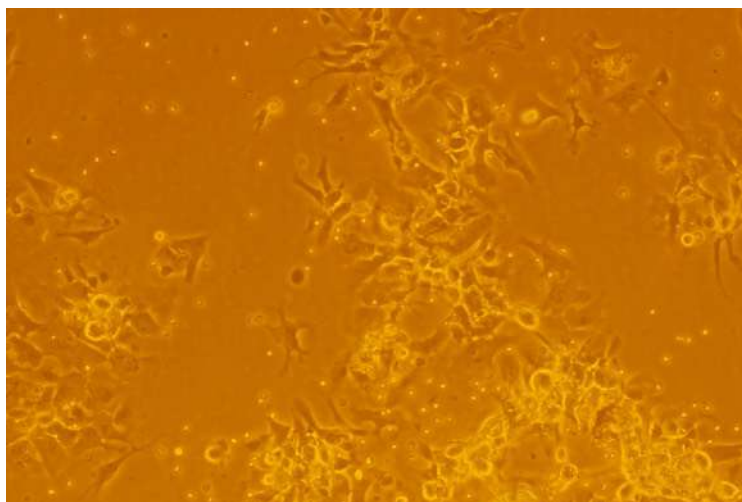


Рисунок 2.5. – Назальные хондроциты человека, первый пассаж. Плотные скопления клеток и прикрепленные распластанные клетки. Световая микроскопия, Увеличение $\times 100$

2.8.5. Выделение и культивирование назальных хондроцитов кролика

Для получения данного клеточного компонента в настоящем исследовании использовалась хрящевая часть перегородки носа кролика-донора породы «Серый великан». Хирургическую манипуляцию проводили в асептических условиях под общей анестезией (внутримышечное введение комбинации препаратов «Ксила» в дозе 0,1 мл/кг и «Золетил-100» в дозе 0,1 мл/кг). Материал для клеточной изоляции выделялся биопсийными щипцами и скальпелем в виде отдельных проб из хрящевой ткани носовой перегородки. Протокол выделения назальных хондроцитов из биопсии перегородки носа кролика аналогичен протоколу, приведенному в пункте 2.8.4.

2.9. Ревитализация матриксов-носителей и создание тканеинженерных конструкций – тканеинженерной трахеи кролика

2.9.1. Ревитализация матриксов-носителей на основе тканей трахеи кролика

Ревитализацию матриксов-носителей на основе девитализированной трахеи кролика проводили с помощью последовательного заселения всей поверхности матриксов мезенхимальными стромальными клетками. При этом внутренняя

поверхность матриксов дополнительно заселялась и эпителиальными клетками. Для этого на поверхность образцов трахеи заселяли МСК КМ кролика второго пассажа в динамической культуре при вращении с постоянной скоростью 3-4 об/мин в течение 48 ч из расчета 0,25 млн клеток в 10 мкл среды для культивирования МСК КМ на 1 мм² поверхности матрикса-носителя. Затем за 24 ч до имплантации, внутреннюю поверхность ТИК заселяли эпителиальными клетками трахеи кролика первого пассажа из расчета 60×10^3 клеток/мм² и культивировали статичным методом в полнокомпонентной питательной среде для кератиноцитов (KSFM).

Для определения жизнеспособности МСК КМ, заселенных на поверхности матрикса, проводили конфокальную микроскопию с окраской клеток флуоресцентными красителями по методу Live/Dead.

2.9.2. Ревитализация матриксов-носителей на основе хрящевой ткани трахеи человека

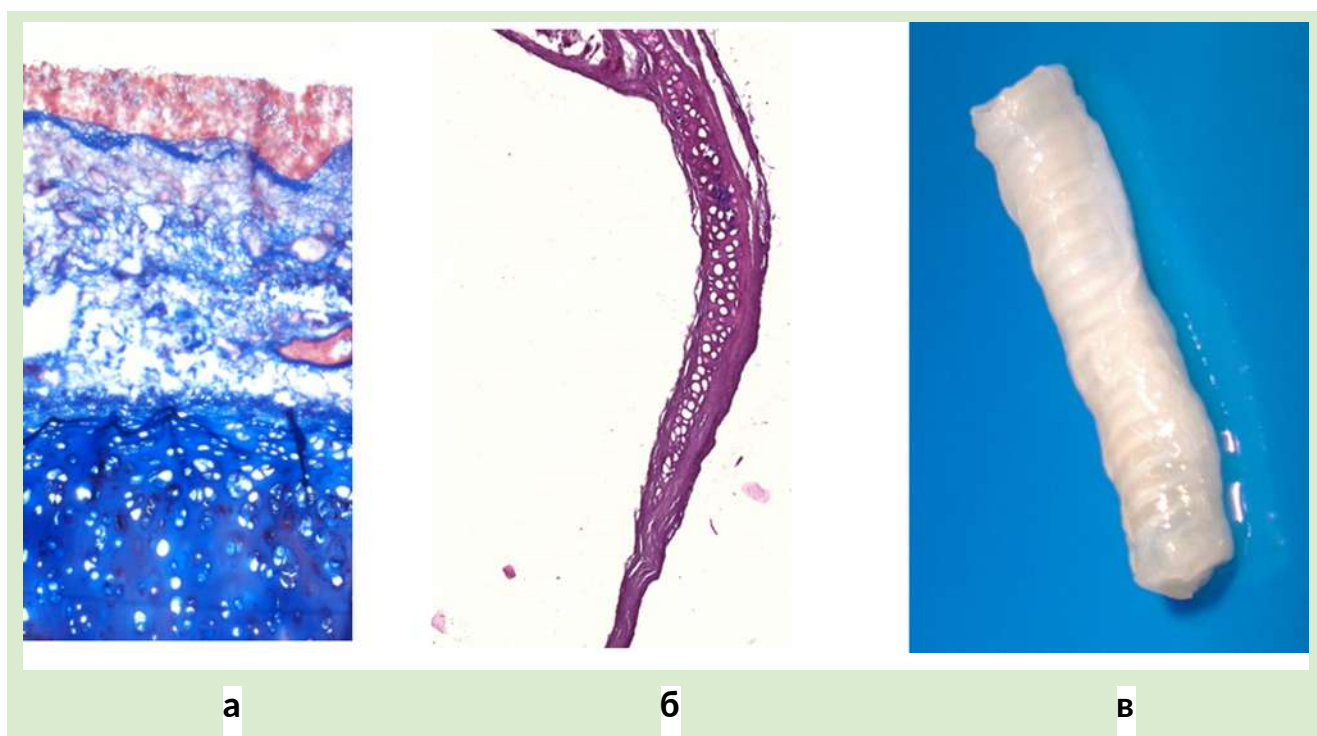
Ревитализацию матриксов-носителей, представляющих собой девитализированную хрящевую ткань трахеи человека, подвергнутую лазерному травлению, проводили с помощью одномоментного заселения всей поверхности матриксов назальными хондроцитами. Перед выполнением ревитализации образцы рандомизированно делились на две группы. На поверхность одних образцов ($n = 8$) заселяли назальные хондроциты (НХ) человека второго пассажа, а на поверхность других образцов ($n = 8$) – НХ кролика. В качестве контрольной группы были использованы образцы девитализированной хрящевой ткани трахеи человека, не подвергавшейся лазерному травлению. Ревитализация выполнялась в статической культуре на полупроницаемой мембране (trans-well culture) в 24-луночной планшете со вставками для культивирования на полупроницаемой мембране (ThermoFisher, США) с диаметром пор 0,22 мкм из расчета 0,25 млн клеток на 1 мм² поверхности матрикса-носителя. Во вставку с полупроницаемой мембраной добавляли 50 мкл среды для культивирования НХ, во внешнюю лунку – 750 мкл. Образцы культивировали в течение 7 суток в инкубаторе при температуре +37 °C с 5%-м CO₂.

Состояние межклеточного вещества и клеточного компонента тканеинженерной конструкции оценивалось при помощи гистологического исследования с окраской препаратов гематоксилином и сафранином-о.

2.10. Разработка экспериментальной хирургической модели критического дефекта трахеи для оценки эффективности применения тканеинженерных конструкций различных типов

В рамках разработки экспериментальных хирургических методов моделирования критического дефекта трахеи выполнялись предварительные исследования (“pilot studies”) на крысах линии Вистар (Wistar) возрастом от 3 до 6 месяцев и массой тела от 200 до 400 г. Животных содержали в условиях Центрального вивария Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России при свободном доступе к пище и воде. В качестве материала для имплантации в моделируемый дефект использовались фрагменты аллогенной децеллюляризированной трахеи. Трахея крысы-донора резецировалась в ходе острого эксперимента и децеллюляризовалась по оригинальному детергент-энзиматическому протоколу на основе воздействия гипоосмолярной жидкостью (стерильная дистиллированная и деионизированная вода), 6%-го и 10%-го растворов диметилсульфоксида (DMSO, Sigma, США), 4%-го раствора дезоксихолата натрия, Тритона X-100, CHAPS и ДНКазы (20 ЕД/мл, Sigma, США) (Барановский Д., 2017). Использование данного протокола позволяло получать образцы с содержанием остаточной ДНК не более $4,12 \pm 1,22\%$ относительно количества ДНК в нативном образце трахеи. Такие матрицы практически не обладают иммуногенными свойствами (Baiguera S., 2014).

Гистологическое исследование также не выявило признаков наличия клеточного содержимого в децеллюляризованных тканях (Рисунок 2.6.)



Примечание. (а) Стенка нативной трахеи крысы, гистологическое исследование, окраска гематоксилин-эозин, $\times 100$ (б) образец матрикса, полученного при децеллюляризации нативной трахеи крысы по детергент-энзиматическому протоколу: визуализируются пустые клеточные лакуны в толще хрящевой ткани, гистологическое исследование, окраска гематоксилин-эозин, $\times 10$ (в) образец матрикса, полученного при децеллюляризации нативной трахеи крысы по детергент-энзиматическому протоколу, макроскопический вид

Рисунок 2.7. – Результат децеллюляризации нативной трахеи крысы по оригинальному детергент-энзиматическому протоколу

За животным проводили непрерывное наблюдение до выхода из наркоза и ежедневный контроль в течение 3 недель после операции. В первые сутки после операции была подтверждена гибель всех пяти животных контрольной группы, у которых дефект переднебоковой стенки трахеи был оставлен интактным. Животные с восстановленной целостностью трахеи смогли продолжить нормальную жизнедеятельность, восстановив двигательную активность и нормальный активный прием пищи через 1–5 суток после операции, при этом для животных, подвергавшихся изолированной резекции переднебоковой стенки, период восстановления был значительно более коротким (не более 2 суток), в сравнении с животными, перенесшими циркулярную резекцию.

2.11. Имплантации тканеинженерной трахеи кролика *in vivo*

2.11.1. Выполнение ортотопических имплантаций тканеинженерной трахеи кролика

Экспериментальные работы выполнены на кроликах породы «Серый Великан» ($n = 3$) исходной массой тела 3,5–4,5 кг в возрасте 0,5–1 год, выращенных в питомнике Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России (пос. Светлые Горы, МО). Животных содержали в условиях Центрального вивария Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России при свободном доступе к пище и воде.

Все манипуляции с лабораторными животными были одобрены Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России и выполнялись с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005 г.), и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010.

Хирургические операции выполнялись с учетом анатомо-топографических особенностей строения шеи кролика: в частности, пищевод кролика располагается слева от трахеи (Рисунок 2.8).

Хирургические операции проводили в асептических условиях под общей анестезией (внутримышечное введение комбинации препаратов «Ксила» в дозе 0,1 мл/кг и «Золетил-100» в дозе 0,1 мл/кг, дополненное локальной анестезией операционного поля раствором Новокаина 0,5%). Для ортотопической имплантации ТИТ получали доступ к шейному отделу трахеи через продольный разрез по средней линии шеи от перстневидного хряща к яремной вырезке, протяженностью до 1 см с рассечением платизмы и разделением мышечных тканей и фасций шеи тупым и острым путем. Тупым путем мобилизовывались передняя и боковые стенки трахеи.

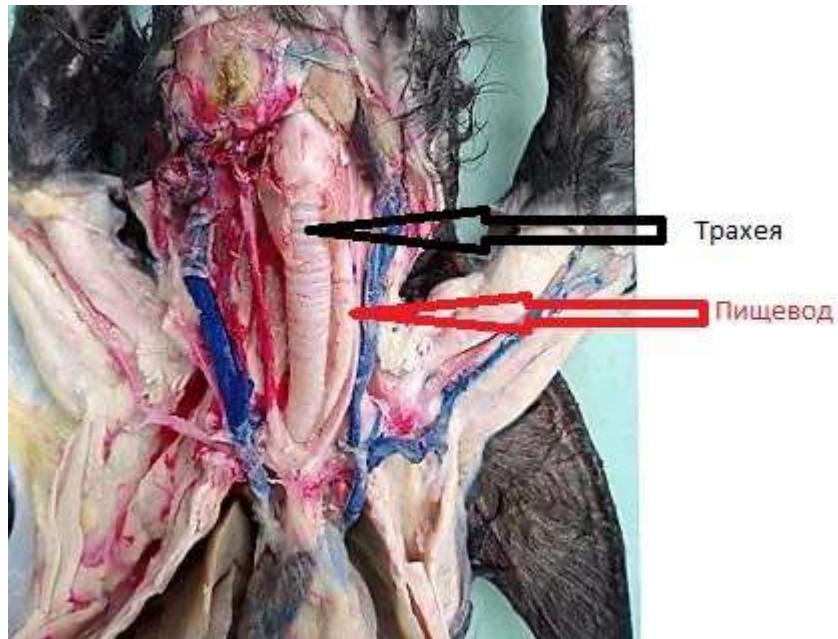
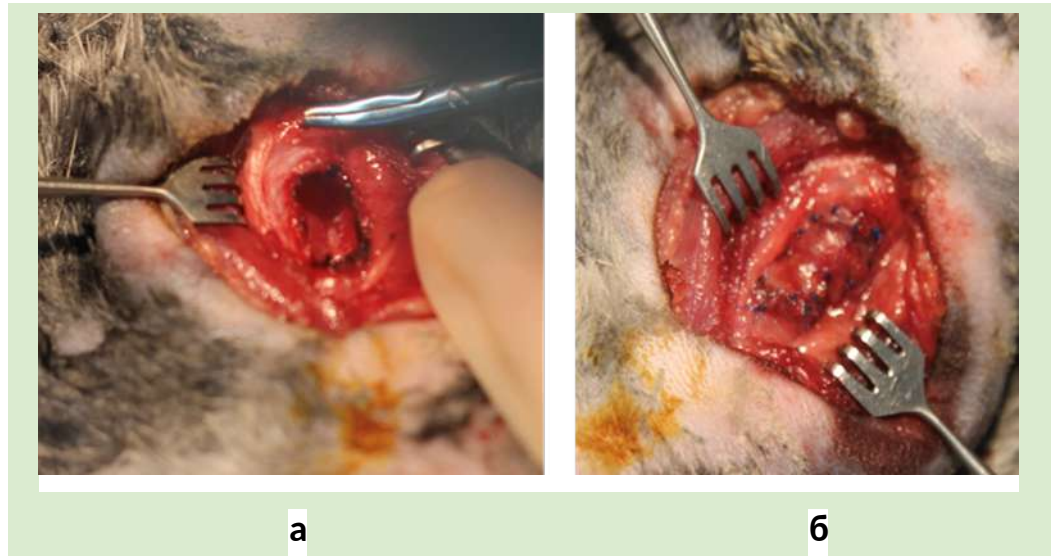


Рисунок 2.8. – Взаимное расположение трахеи и пищевода кролика, макропрепарат

Мобилизация левой боковой стенки трахеи выполнялась с особой осторожностью во избежание повреждения пищевода. Отступая от задней стенки трахеи 1,5–2 мм с каждой стороны, микрохирургическими ножницами резецировали переднебоковую стенку на протяжении пяти колец ниже второго кольца трахеи с формированием окна размерами $6-7 \times 4$ мм. Выполняли тщательный гемостаз коагуляцией сосудов подслизистой оболочки. Размеры ТИТ корректировали интраоперационно под размер дефекта, фиксировали ТИТ в области имплантации отдельными швами инертным нерезорбируемым материалом Пролен 6-0 с закрытием дефекта переднебоковой стенки. При наложении швов на левую боковую стенку пищевод отводился влево микрохирургическим зеркалом. Выполняли гемостаз, проверяли герметичность шва трахеи, послойно ушивали рану (Рисунок 2.9). Оперативные вмешательства выполнялись без использования ИВЛ и миорелаксации, свободное дыхание животного обеспечивалось через естественные дыхательные пути или дефект в стенке трахеи на этапах операции до его закрытия. За животным проводили наблюдение до выхода из наркоза. В течение 5 суток после операции проводили антибиотикотерапию препаратом «Байтрил» и анальгетическую терапию препаратом «Кетанов» (30 мг/мл) в дозе 0,5 мл в сут.



Примечание. (а) критический дефект переднебоковой стенки трахеи; (б) ТИТ в ортотопической позиции с закрытием критического дефекта

Рисунок 2.9. – Ортотопическая имплантация ТИТ кролику, общий вид операционной раны

2.11.2. Оценка состояния тканеинженерной трахеи кролика *in vivo*

Для визуализации и оценки состояния трахеи в области ортотопической имплантации ТИТ, а также оценки имплантата *in vivo*, кроликам выполняли Мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) через 3 месяца после имплантации. МСКТ проводили на установке One Aquilion (Toshiba) и получали изображения в формате DICOM. Для наглядной оценки состояния дыхательных путей и просвета трахеи создавали 3D-модель дыхательных путей в формате STL при помощи метода волюметрического сегментирования в программе 3D Slicer (США).

2.11.3. Вывод животных из эксперимента и забор тканеинженерной трахеи для морфологического анализа

Животных выводили из эксперимента спустя 6 мес. препаратом «Ксила» (1,0 мл на 1 кг массы тела животного). Аутопсийный материал забирали в границах интактной трахеи, отступая не менее 5 мм от краев имплантата. Трахея с имплантированной ТИТ извлекалась и разрезалась на две части вдоль, в сагиттальной проекции.

Для морфологической оценки результатов проведенной имплантации ТИК, образцы трахеи фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном растворе формалина в течение 24 ч, проводили через гистологическую проводку и заключали в парафиновые блоки по стандартному протоколу для гистологического исследования.

2.12. Имплантации тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи человека *in vivo*

2.12.1. Гетеротопические имплантации тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи человека

Экспериментальные работы выполнены на линейных безтимусных мышах “nude mice” ($n = 2$), выращенных в питомнике Института хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля. Животных содержали в условиях Центрального вивария Института хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля при свободном доступе к пище и воде.

Хирургические операции проводили в асептических условиях под ингаляционной анестезией (Изофлюран). Для гетеротопической имплантации ксеногенной ТИК выполняли продольный разрез кожи в межлопаточной области протяженностью до 1 см и формировали четыре подкожных кармана тупым и острым путем по два с каждой стороны. ТИК размещали подкожно, по одной в каждый из сформированных карманов, и ушивали рану (Рисунок 2.10). За животным проводили наблюдение до выхода из наркоза.

2.12.2. Ортотопические имплантации тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи

Экспериментальные работы выполнены на кроликах-реципиентах породы «Серый Великан» ($n = 8$) исходной массой тела 3,5–4,5 кг в возрасте 0,5–1 год, выращенных в питомнике Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России (пос. Светлые Горы, МО). Животных содержали в условиях Центрального вивария Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России при свободном доступе к пище и воде.

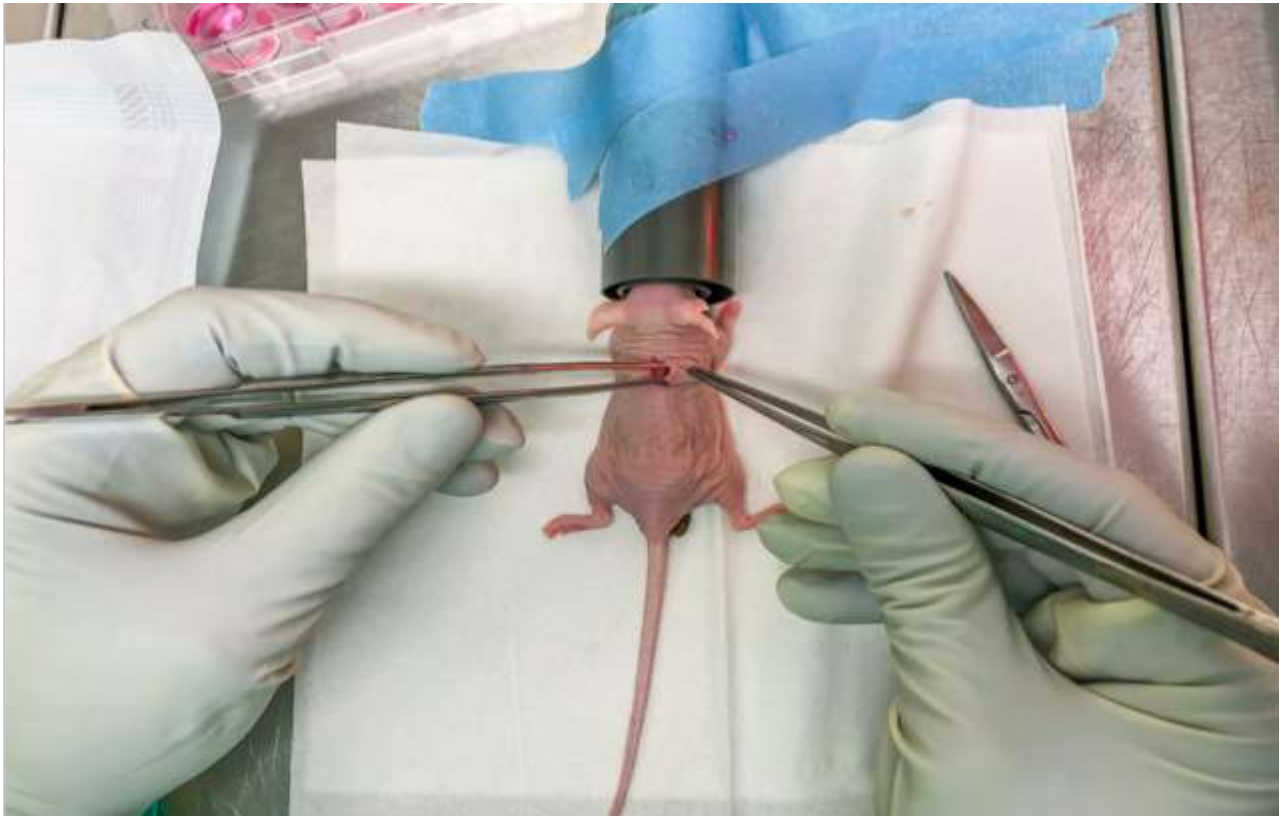


Рисунок 2.10. – Гетеротопические подкожные имплантации ксеногенных ТИК бестимусной мыши

Все манипуляции с лабораторными животными были одобрены Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России и выполнялись с соблюдением правил биозтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005 г.), и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010.

Хирургические операции проводили в асептических условиях под общей анестезией (внутримышечное введение комбинации препаратов «Ксила» в дозе 0,1 мл/кг и «Золетил-100» в дозе 0,1 мл/кг, дополненное локальной анестезией операционного поля раствором Новокаина 0,5%). Для ортотопической имплантации ТИК получали доступ к шейному отделу трахеи аналогично оперативной технике, приведенной в пункте 2.10.1. Переднебоковую стенку трахеи резецировали на протяжении трех колец ниже второго кольца трахеи с формированием окна. ТИК фиксировали в области имплантации отдельными

швами инертным нерезорбируемым материалом Пролен 7-0 с закрытием дефекта переднебоковой стенки, проверяли герметичность шва трахеи, послойно ушивали рану (Рисунок 2.11). За животным проводили наблюдение до выхода из наркоза. В течение 5 сут. после операции проводили антибиотикотерапию препаратом «Байтрил» и анальгетическую терапию препаратом «Кетанов» (30 мг/мл) в дозе 0,5 мл в сут. Все оперативные вмешательства также выполнялись с сохранением свободного дыхания животного через естественные дыхательные пути или сформированный дефект в стенке трахеи на этапах операции до его закрытия имплантатом.



Примечание. (а) визуализирована переднебоковая стенка трахеи кролика, (б) ТИК в ортотопической позиции, макросъемка операционного поля

Рисунок 2.11. – Ортотопическая имплантация ТИК хрящевой ткани трахеи кролику, общий вид операционной раны

2.12.3. Вывод животных из эксперимента и забор тканеинженерной конструкции для морфологического анализа

Животных выводили из эксперимента спустя 8 недель после имплантации углекислым газом в гиперкапнической камере. Аутопсийный материал забирали непосредственно из области имплантации, отступая не менее 1 мм от краев имплантата. Для морфологической оценки результатов образцы ТИК фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном растворе формалина в течение 24 ч, проводили через гистологическую проводку и заключали в парафиновые блоки по стандартному протоколу для гистологического исследования.

2.13. Критерии оценки физиологической совместимости и эффективности тканеинженерной конструкции

В качестве диагностических признаков при оценке физиологической совместимости и эффективности ТИК использовались:

- процент сужения просвета трахеи в области фиксации тканеинженерной конструкции (Φ_3), при сужении на 75% и более, присваивали 0 баллов, менее 75% – 1 балл;

– эпителизация внутренней поверхности тканеинженерной конструкции (Π_3), при полной эпителизации – 1 балл, при отсутствии эпителизации или частичной эпителизации – 0 баллов;

– плотность микрососудов в подслизистом слое тканеинженерной конструкции (B_c), при плотности 0–25 мм⁻² присваивают 0 баллов, при 26–50 мм⁻² – 1 балл, более 50 мм⁻² – 2 балла;

Рассчитывали значение $\mathcal{E}_{cb}$ (эффективность конструкции), соответствующее произведению баллов, по формуле: $\mathcal{E}_{cb} = \Phi_3 \times \Pi_3 \times B_c$, и в случае рассчитанного значения $\mathcal{E}_{cb} < 1$ делали вывод об отсутствии жизнеспособности тканеинженерной конструкции, при $\mathcal{E}_{cb} \geq 1$ делали вывод о жизнеспособности тканеинженерной конструкции и эффективности ее имплантации.

2.14. Статистическая обработка

Полученные данные были статистически обработаны в программе GraphPad Prism 7 в соответствии с непараметрическим U-критерием Манна – Уитни. В качестве уровня статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Заключение по Главе 2

Предлагаемые к использованию в данной работе материалы и методы соответствуют общепринятым в экспериментальной хирургии, современной тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Моделирование критического дефекта трахеи у лабораторного животного осуществлялось путем окончатой резекции переднебоковой стенки на протяжении 5 колец.

Для изготовления матриксов-носителей использовались биodeградируемые материалы, представляющие собой нативные или кадаверные девитализированные ткани человека и животных. Матриксы-носители с модифицированной микроархитектоникой получали с помощью современного метода лазерного травления хрящевой ткани трахеи человека. Применены современные методы ревитализации скаффолдов клеточными культурами.

Методы исследования и оценки морфометрических параметров, микроархитектоники и биосовместимости матриксов-носителей и готовых ТИК соответствуют поставленным в работе задачам. Оценку биологической совместимости матриксов-носителей выполняли с помощью стандартного МТТ-теста. Оценку эффективности модификации хрящевой ткани трахеи человека на уровне микроархитектоники проводили методом сканирующей электронной микроскопии, Микро-КТ и гистологических исследований. Оценку качества ревитализации ТИК проводили с помощью гистологических исследований с окраской Гематоксилином и Сафранином-О.

Оценку физиологической совместимости и физиологического эффекта ТИТ на основе девитализированной трахеи кролика проводили при имплантации материала в ортотопическую позицию кроликам с оценкой просвета трахеи, положения ТИТ в области имплантации и признаков тканевой реакции с помощью МСКТ и гистологических исследований через 3 и 6 месяцев после имплантации.

Оценку биологической и физиологической совместимости, а также эффективности ТИК на основе хрящевой ткани трахеи человека проводили при имплантации ТИК подкожно безтимусным гипоимунным мышам и имплантации в ортотопическую позицию кроликам.

Примененная в работе комбинация материалов и методов ранее использована не была.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Разработка тканеинженерной конструкции трахеи

.Сложная архитектура и организация внутренней структуры трахеи и бронхов, а также хрящевых тканей, входящих в состав их стенки, создают трудности для их полноценной реконструкции. Тем не менее, воздухоносные пути животных и человека могут выполнять свою основную функцию при сохранении минимально необходимого функционала и основных параметров входящих в их состав тканей. Поэтому современные концепции разработки ТИК, как правило, основаны на принципах упрощения биологической сложности нативных органов применительно к ТИК (Badylak S., 2011), то есть без необходимости полноценного выполнения физиологических функций и прецизионного повторения внутренней организации моделируемых тканей из слоев специализированных клеток и без точного воспроизведения внутренней микроциркуляции (Клабуков И., 2018). В этом случае неоспоримым преимуществом ТИК, основанных на аллогенных кадаверных тканях, является возможность максимального сохранения микроархитектоники исходной нативной ткани при создании матрикса-носителя. Химическая децеллюляризация нативных тканей с применением детергентов позволяет более эффективно удалять клеточные компоненты, в то же время гистологические исследования демонстрируют высокую степень деструкции межклеточного вещества (Барановский Д., 2017) с потерей гликозаминогликанов хрящевым матриксом, что может привести к частичной или полной потере своих нативных механических свойств хрящевой ткани. Результатом же данных экспериментальных исследований по децеллюляризации нативных хрящевых тканей трахеи должно было стать создание высокоплотных матриц-носителей, представляющих собой полностью девитализированную плотную хрящевую ткань трахеи человека с максимально сохранной естественной микроархитектоникой.

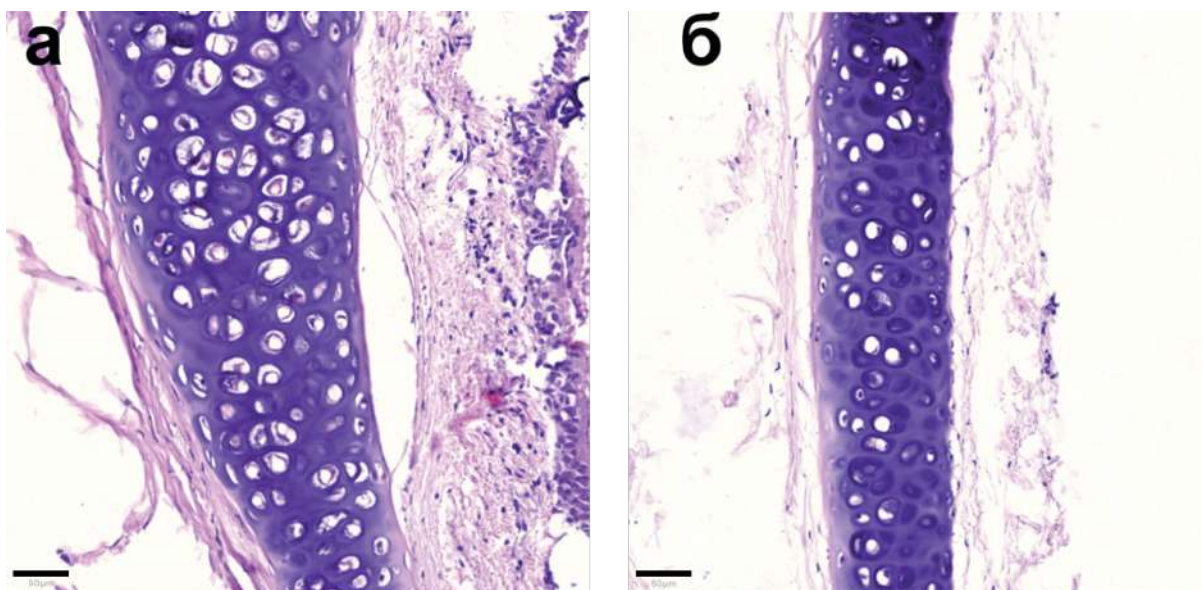
Таким образом, удаление или уничтожение клеточной составляющей нативной ткани должно производиться наиболее щадящим способом, а ревитализация матрикса-носителя требует использования клеточных ресурсов,

максимально соответствующих таковым в исходной нативной ткани. Использование повторяющихся циклов «замораживание – оттаивание» использовалось для получения децеллюляризованных хрящей в работах Roth и соавт. (2017) и Chang и соавт. (2014), которые показали пригодность данного метода для получения матриксов, предназначенных для их дальнейшей витализации клетками.

3.2. Создание тканеинженерной трахеи кролика на основе заселенных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и клеток легочного эпителия девитализированного матрикса

3.2.1. Девитализация трахеи кролика

Девитализированную методом замораживания-оттаивания трахеальную ткань сравнивали с нативной тканью трахеи кролика гистологическим методом с окраской гематоксилином и эозином (Рисунок 3.1). В части Рисунка 3.1б представлена ткань хрящевого кольца трахеи, вокруг которого видны разрушенные ткани перихондрия, подслизистой оболочки и эпителия. Структура хрящевой ткани при этом сохранена. В глубине ткани наблюдаются оставшиеся хондроциты в лакунах. Архитектоника хрящевой ткани существенных изменений не претерпела, что позволяет предполагать сохранение ее механической прочности.



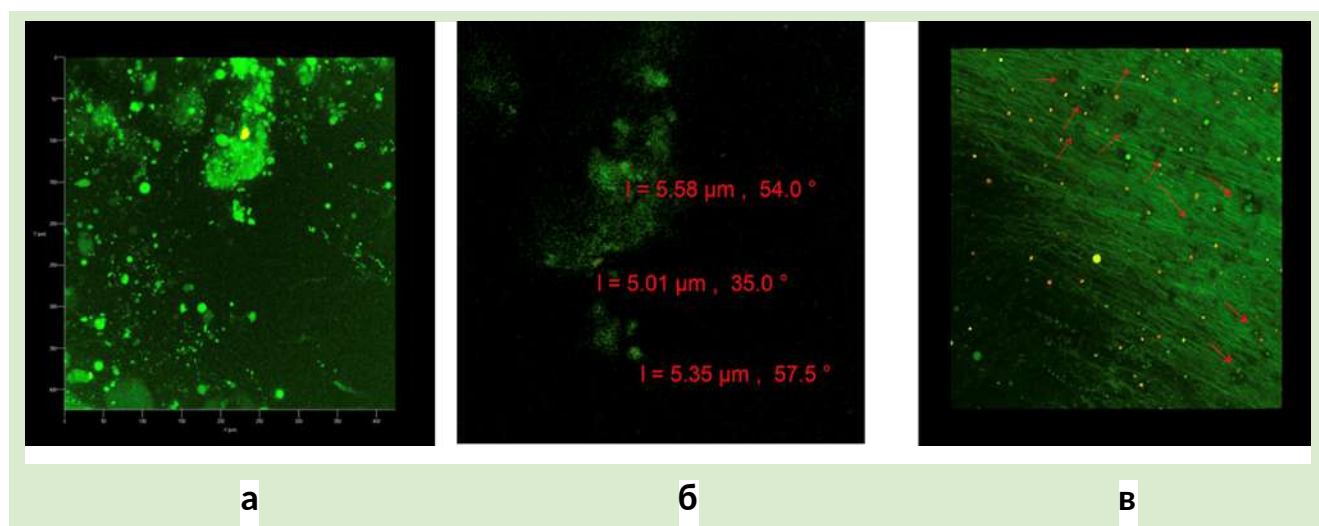
Примечание. (а) ткань нативной трахеи; (б) девитализированная трахея. Окраска гематоксилин-эозин. Масштабный отрезок 50 мкм. Увеличение $\times 100$

Рисунок 3.1 – Образец хрящевой ткани трахеи после выполнения девитализации. Цитотоксичность полученных таким образом матриксов-носителей, оцененная по клеточной активности МСК КМ после добавления экстракта девитализированной трахеи кролика в сравнении контрольной группой, составила $144,3 \pm 3,8\%$ ($p < 0,05$).

3.2.2. Создание тканеинженерной трахеи кролика и оценка приживления тканеинженерной трахеи после имплантации в ортотопическую позицию

Путем витализации матрикса-носителя создана ТИК трахеи кролика, полностью заселенная на поверхности МСК КМ (при этом большинство их составляли окрашенные кальцеином-АМ жизнеспособные клетки) и клетками легочного эпителия кролика на внутренней поверхности ТИК.

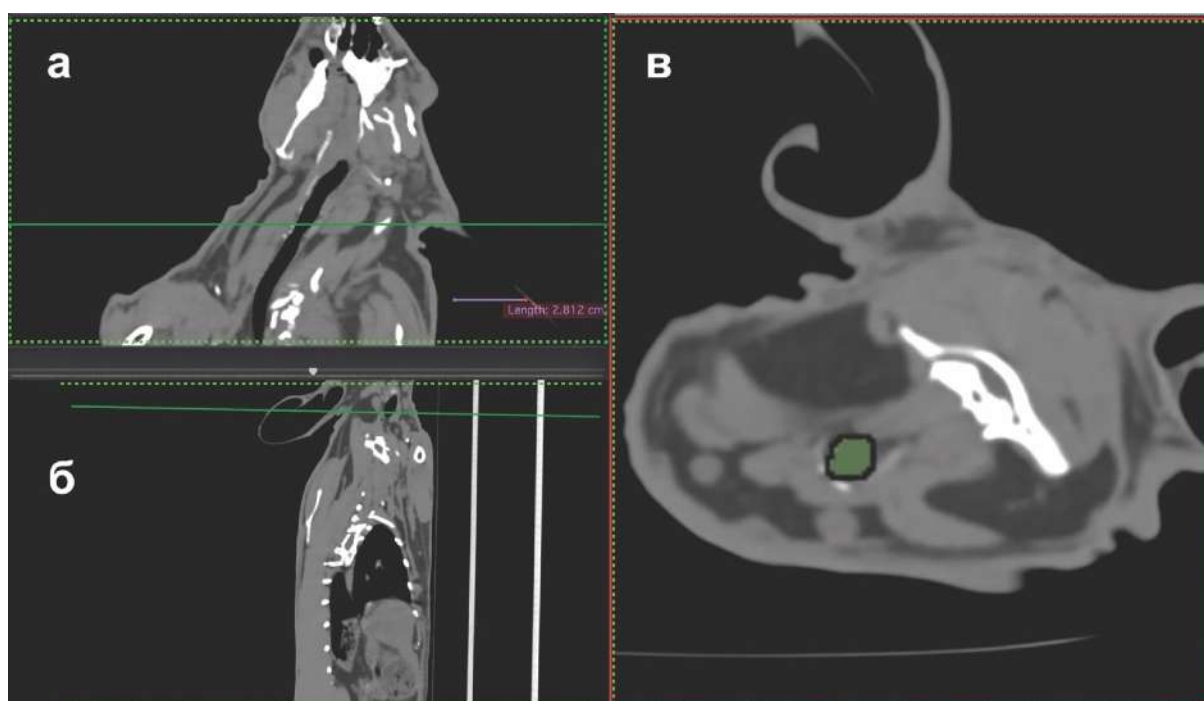
Конфокальная микроскопия позволила визуализировать жизнеспособные МСК КМ кролика на внешней поверхности матрикса и жизнеспособные КЛЭ на внутренней его поверхности (Рисунок 3.2).



Примечание. (а) КЛЭ на внутренней поверхности ТИТ, (б) прицельная визуализация колонии КЛЭ с метрическими данными (мкм), (в) МСК КМ на внешней поверхности ТИТ (отмечены стрелками)

Рисунок 3.2 – ТИТ кролика до имплантации, конфокальная микроскопия, окрашивание “life-dead”

Для промежуточной оценки приживления ТИТ и состояния просвета трахеи через 3 мес. после имплантации была проведена КТ под общей анестезией. Набор срезов был преобразован в объемное изображение, с которого получены снимки в трех плоскостях: сверху (Рисунок 3.3а), сбоку (Рисунок 3.3б) и спереди (Рисунок 3.3в). Было отмечено небольшое сужение в области имплантации не более $\frac{1}{3}$ просвета трахеи, что видно выше и ниже зеленой линии (плоскости срезов фотографий) на Рисунок 3.3а. Для того, чтобы полностью оценить величину сужения относительно всего просвета трахеи, была создана объемная модель, область сегментации показана зеленым на Рисунке 3.3в.

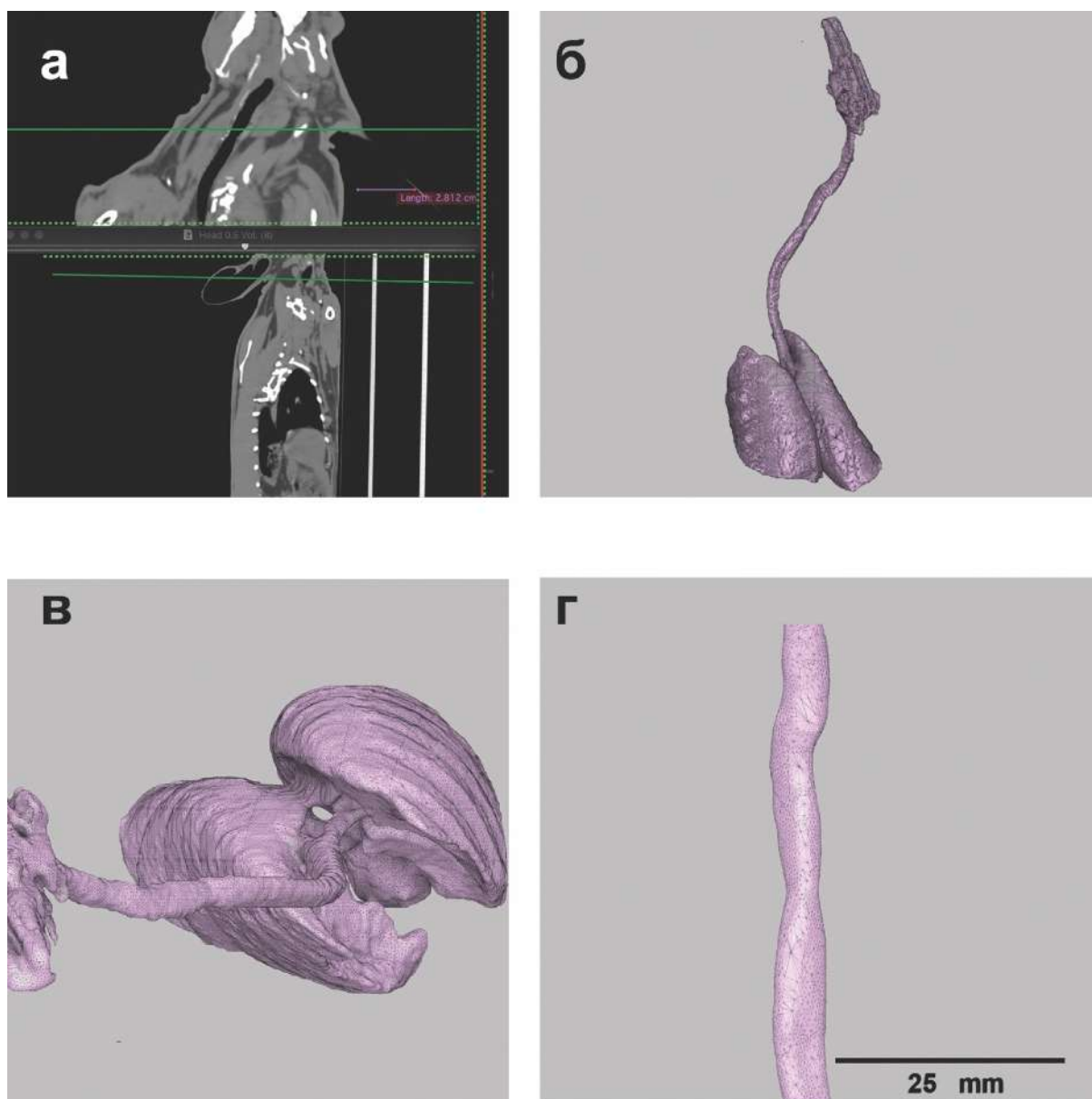


Примечание. (а) сверху, (б) сбоку и (в) спереди. Зеленая линия (а, б) — плоскость среза изображений. Зеленая область (в) — область автоматической сегментации дыхательных путей

Рисунок 3.3 – КТ шеи и грудной клетки кролика, плоскости изображений

На Рисунке 3.4 представлена трехмерная цифровая модель дыхательных путей кролика, включающая в себя мягкие ткани глотки и носоглотки, гортань, трахею до бифуркации, бронхи и мягкие ткани легких. На Рисунке 3.4г показана зона имплантации, при этом видно, что присутствует незначительное сужение просвета. В области имплантации стенозирования не наблюдалось.

Морфологическое гистологическое исследование не выявило в зонах имплантации ТИТ ни гранулярных лейкоцитов, ни лимфоцитов, что указывает на отсутствие признаков гнойного воспаления или асептического некроза вокруг материала ТИТ (Рисунок 3.5, а, в). Это свидетельствует об отсутствии развития осложнений у животного в ходе эксперимента, связанных с тканевой реакцией на имплантат и развитием инфекционных заболеваний дыхательных путей.

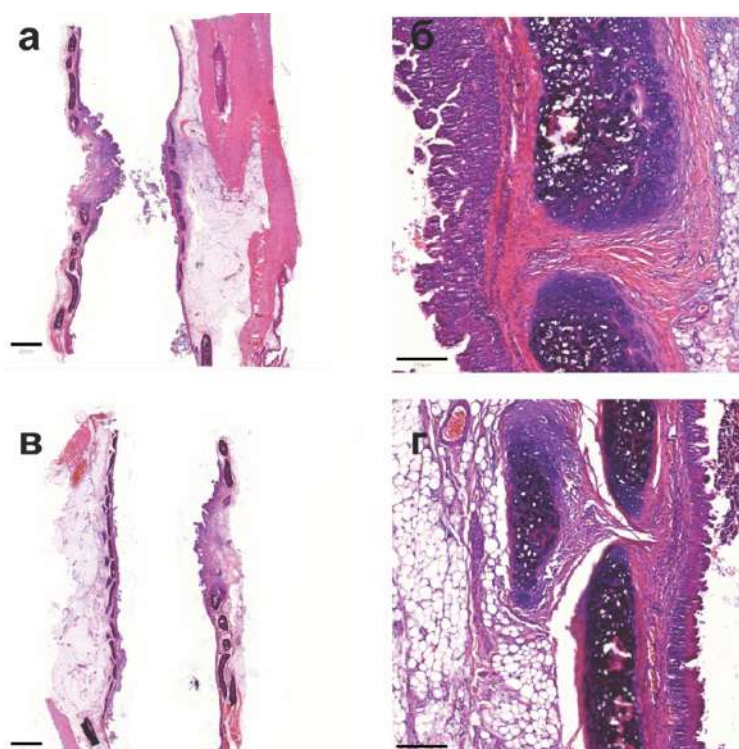


Примечание. (а) МСКТ снимок области имплантации ТИТ; (б, в) общий вид модели дыхательных путей; (г) модель просвета трахеи в области имплантации

Рисунок 3.4 – Модель дыхательных путей кролика

Была установлена причина сужения просвета, выявленного на 3 мес. при помощи КТ. С правой стороны трахеи (Рисунок 3.5а) развилась хроническая

воспалительная реакция вокруг шовного материала, которая привела к частичному разрушению имплантата в этой области, замещению соединительной тканью и гипертрофии эпителиального слоя с повышением содержания бокаловидных клеток, продуцирующих слизь. Это хорошо видно на задней стенке трахеи (Рисунок 3.5б), где эпителий стал утолщен, и образовались полипы. С противоположной стороны относительно разреза участок воспаления уменьшился в размерах, из чего следует, что реакция на шовный материал имела локальный характер. Ткань на удалении от описанного шовного материала имела нормальную морфологию. Как видно на Рисунке 3.5г, эпителий на имплантате не был гиперплазирован; ткани трахеи и имплантата срослись, наблюдались два ряда хрящевых колец: крупные – нативные, более мелкие – участки ТИТ. Подслизистый слой был представлен разнонаправленными пучками коллагеновых волокон, которые окружали участки резорбции хрящевых структур имплантата, разрушаемых макрофагами.



Примечание. (а, в) обзорное изображение тканей трахеи с двух сторон относительно разреза, масштабный отрезок 2 мм; (б, г) участки слизистой оболочки на удалении от очага воспаления, масштабный отрезок 200 мкм

Рисунок 3.5 – Образец ткани трахеи кролика на 6 месяц после имплантации конструкции, окраска гематоксилин-эозин

На Рисунке 3.6 приведены результаты иммунофлюоресцентного окрашивания на СКРап (Рисунок 3.6, а, б, в), белки межклеточных взаимодействий – кадгерины Е (CDH1) (Рисунок 3.6г), маркер клеточной пролиферации Ki-67 (Рисунок 3.6, а, б). Участок ТИТ кролика без признаков воспаления от шовного материала представлен на Рисунке 3.6а. Видно, что эпителий имеет нормальную морфологию, при этом пролиферирующие клетки (Ki-67) находятся преимущественно в подслизистом слое. В области воспаления (Рисунок 3.6б) Ki-67 положительные клетки наблюдаются как в подслизистом, так и эпителиальном слое, что говорит о постоянной пролиферации клеток. Эпителий в зоне воспаления также гипертрофирован, что видно по Рисунку 3.6, в, г.

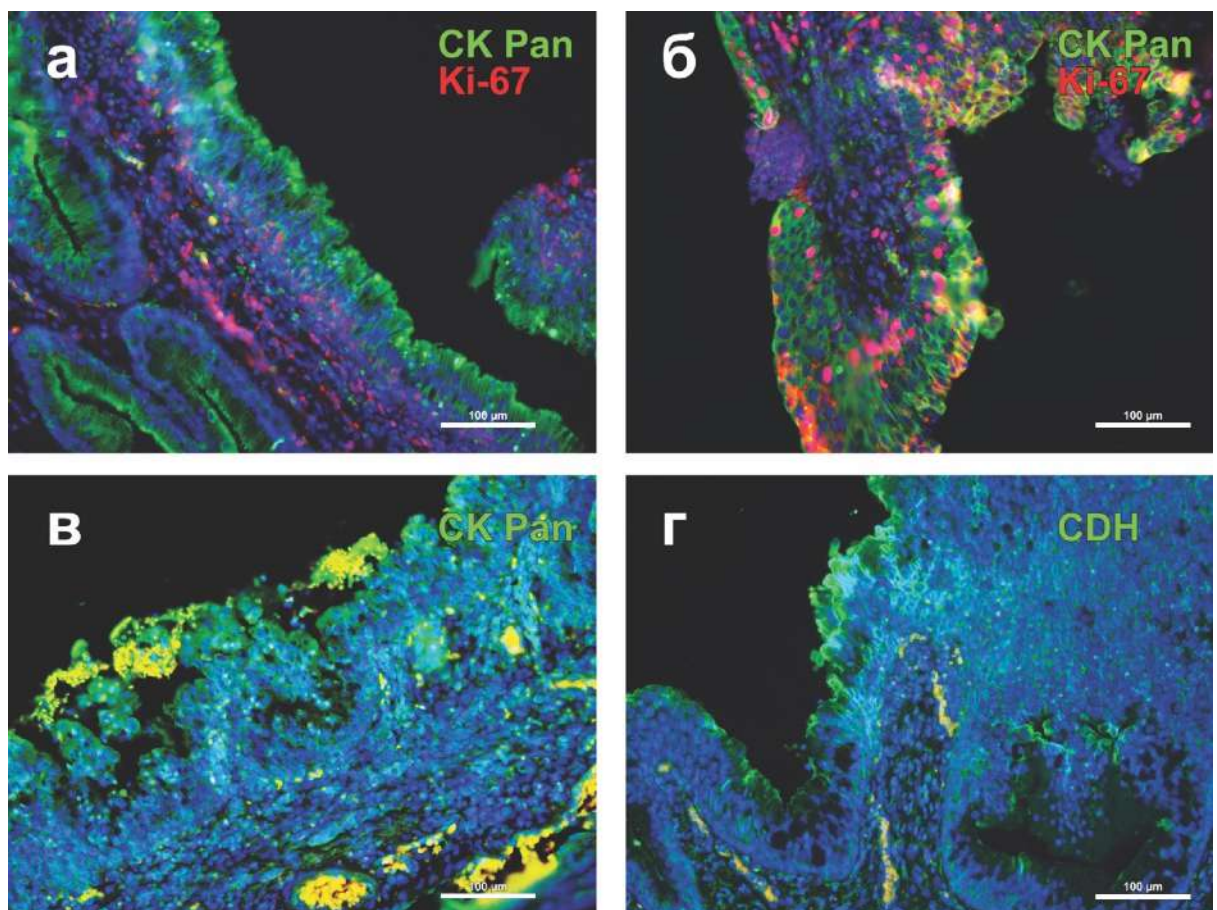


Рисунок 3.6 – Стенка кроличьей трахеи в зоне имплантации. Иммунофлюоресцентная окраска клеточных ядер Hoechst 33342 (голубая флуоресценция). Масштабный отрезок 100 мкм. Увеличение $\times 200$

3.3. Получение тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи человека

3.3.1. Оценка бесклеточных матриксов-носителей на основе кадаверных хрящевых тканей человека с применением методов микроструктурой модификации лазерным излучением (лазерное травление)

Образцы хрящевой ткани трахеи человека были выделены из трахеи, взятой от трупного донора (Рисунок 3.7) для дальнейшей девитализации в соответствии с разработанным протоколом. Использование метода нарезки трахеального хряща до или после децеллюляризации традиционно используется в тканевой инженерии для получения готовых к заселению клетками скаффолдов.



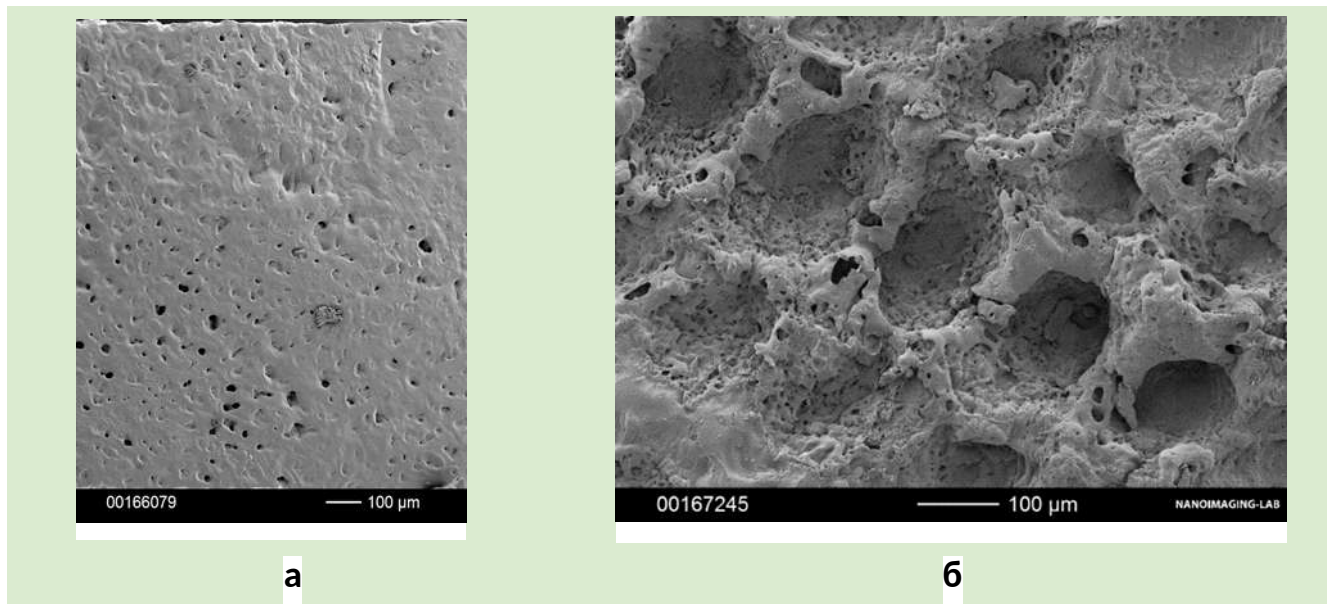
Рисунок 3.7. – Образцы хрящевой ткани трахеи человека в растворе фосфатного буфера (PBS) перед выполнением протокола девитализации

Так в работе Gong A. и соавт. (2011) децеллюляризованный хрящ первоначально нарезался на цилиндры диаметром приблизительно 6 мм, и далее нарезались на листы толщиной 10 мкм и 30 мкм, и уже далее использовались для заселения хондроцитами. В работе Tavassoli A. M. и соавт. (2015) хрящ предварительно нарезался на кусочки толщиной 2 мм, и только затем проводилось его заселение клетками. Таким образом, использование метода предварительной нарезки трахеального хряща на кусочки размерами несколько миллиметров соответствовало существующему мировому опыту тканевой инженерии. В настоящем исследовании хрящевая ткань трахеи человека нарезалась на отдельные фрагменты размерами 5×5 мм перед осуществлением девитализации.

Фрагменты хрящевой ткани, девитализированные повторяющимися циклами замораживания-оттаивания, подвергались лазерной лазерной перфорации с целью формирования матрикса-носителя.

Исследования децеллюляризированной хрящевой ткани трахеи, подвергнутой лазерному травлению, выполнялось с применением различных методов в связи со сложной трехмерной структурой матрикса-носителя: Расположение входных отверстий пор или лунок, а также площадь покрытия перфорациями анализировалась при помощи сканирующей электронной микроскопии с напылением золота (Nova NanoSEM 230, FEI, США). Форма, структура и расположение лунок, образованных при лазерном травлении, визуализировались с использованием методов микрокомпьютерной томографии на аппарате Phoenix nanotom m (General Electric, США). Состояние межклеточного вещества в образцах всех исследуемых и контрольной групп оценивалось при гистологическом исследовании с окраской срезов Сафранином-О.

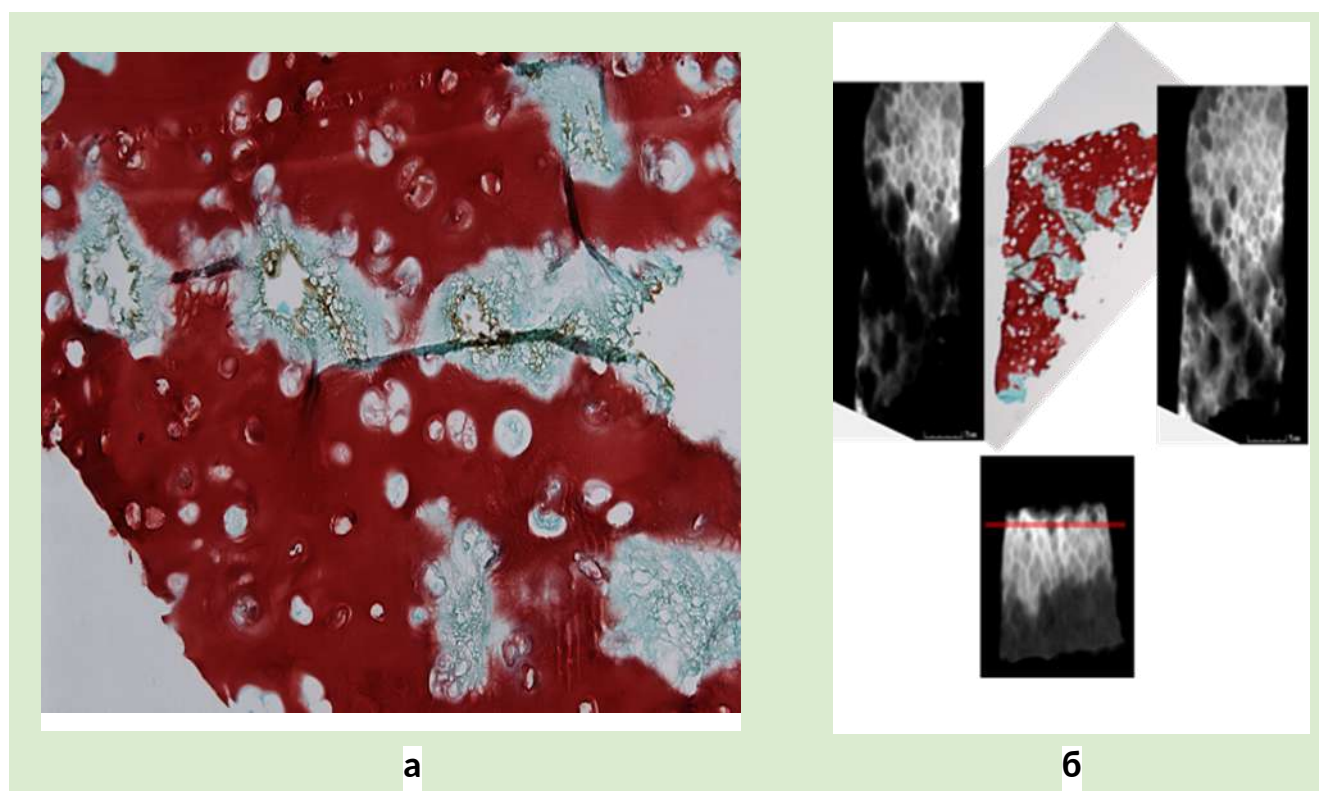
Исследование образцов методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) позволило визуализировать полусферическую структуру лунок диаметром 100 ± 50 мкм, и расстоянием между центрами отверстий равным четырем радиусам входного отверстия поры и площадью покрытия перфорациями $90 \pm 10\%$ общей поверхности образца. В ходе исследования были обнаружены признаки деструкции межклеточного вещества на поверхности образца в промежутках между некоторыми лунками, что может объясняться естественной неоднородностью исходной хрящевой ткани (Рисунок 3.8).



Примечание. (а) Поверхность девитализированной хрящевой ткани трахеи человека,
(б) поверхность матрикса-носителя, полученного в результате лазерного травления девитализированного кадаверного хряща трахеи человека

Рисунок 3.8. – Сканирующая электронная микроскопия с напылением золота

Исследование образцов методом рентгеновской микротомографии позволило измерить глубину лунок на поверхности образцов, которая составила 250–300 мкм. Гистологическое исследование с окраской срезов раствором Сафранина позволило обнаружить богатое гликозаминогликанами межклеточное вещество, преимущественно представляющее матрикс-носитель и соответствующее таковому в нативной хрящевой ткани трахеи человека. Естественная микроархитектоника хрящевой ткани с наличием лакун в структуре межклеточного вещества преимущественно сохранялась и оказывалась поврежденной только в непосредственной близости перфораций. Сопоставление результатов рентгеновской микротомографии и гистологического исследования приведено на Рисунке 3.9.



Примечание. (а) гистологическое исследование, окраска Сафранином-О. Визуализируется просвет лунок на поперечном срезе, сохраняющая микроархитектоника окружающей хрящевой ткани с наличием пустых клеточных лакун, интенсивной красной окраски, соответствующей высокому содержанию гликозаминогликанов; (б) сопоставление результатов рентгеновской микротомографии и гистологического исследования поперечных срезов (перпендикулярно плоскости перфорации), окраска: сафранин-О и гематоксилин.

Рисунок 3.9 – Матрикс-носитель полученный в результате лазерного травления девитализированного кадаверного хряща трахеи человека

Таким образом, результатом лазерного травления стало образование слепых лунок диаметром 150–200 мкм, глубиной до 300 мкм и плотностью около 4 лунок на 1 мм². Полученные образцы 3 раза промывали холодным стерильным раствором PBS и отправляли на стерилизацию гамма-излучением изотопами иридия-192 с поглощенной дозой 1,3 кГр. Ревитализации подвергались стерильные образцы.

Оценка цитотоксичности матриксов-носителей на основе кадаверной хрящевой ткани не выявила признаков цитотоксичности при культивировании назальных хондроцитов в кондиционированной среде матрикса-носителя.

Выживаемость клеток во всех наблюдениях составила более 95%. Значения количественных измерений эндотоксина во всех образцах среды оказались в пределах допустимой нормы. Обобщенная наглядная демонстрация результатов оценки цитотоксичности матриксов-носителей приведена на Рисунке 3.10.

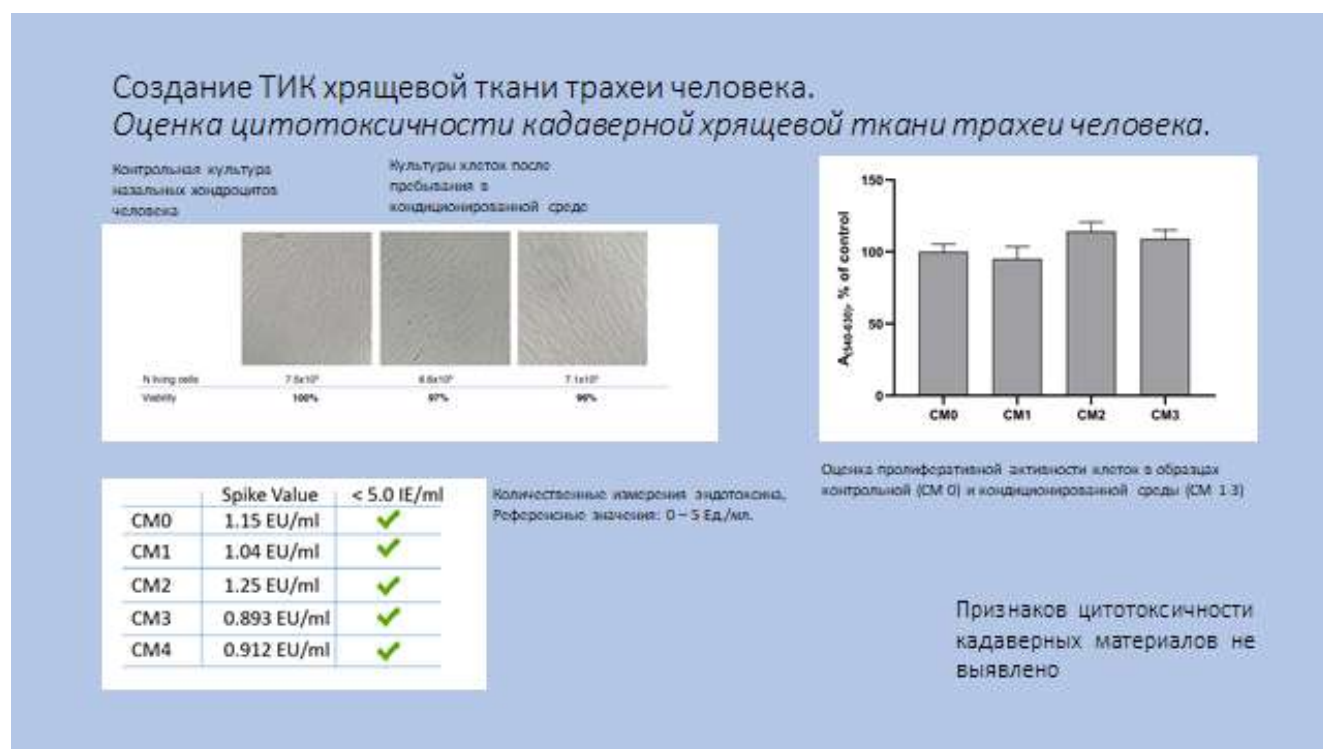


Рисунок 3.10 – Результаты оценки цитотоксичности матриксов-носителей на основе кадаверной хрящевой ткани человека, подвергнутой лазерному травлению

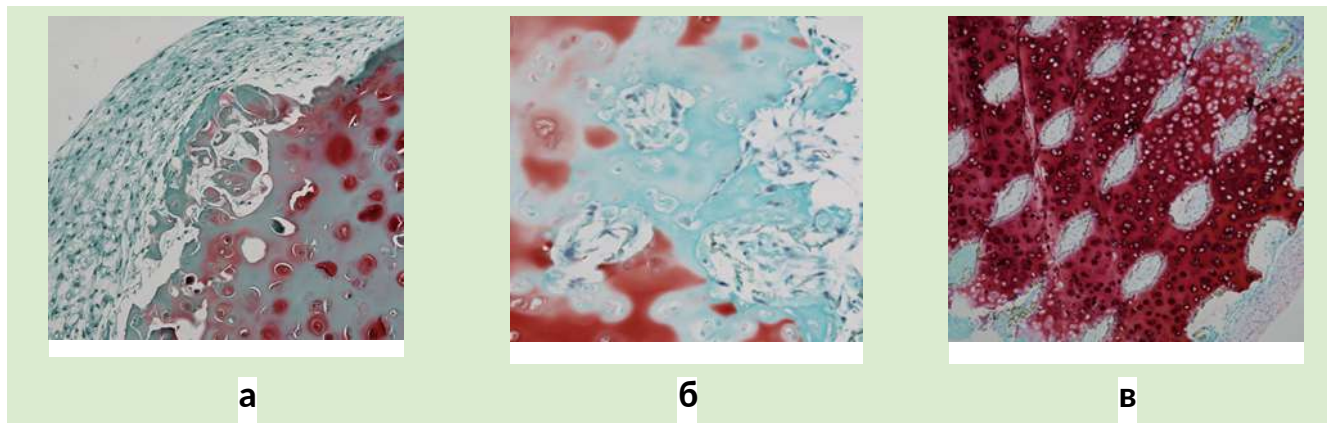
3.3.2. Исследование образцов тканеинженерной конструкции

Объект исследования ТИК – многокомпонетная конструкция, включающая в себя матрикс носитель (девитализированная хрящевая ткань трахеи человека, подвергнутая лазерной перфорации), ревитализированный клеточным компонентом.

Клеточный компонент – ресурс, используемый для ревитализации, на основе живых прекультивированных клеток, заданного количества и пассажа.

Использование сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) не позволило визуализировать перфорации ввиду интенсивной поверхностной колонизации образцов, и в дальнейшем было признано нецелесообразным.

Исследование методом микрокомпьютерной томографии позволило обнаружить сохранность лунок и каналов в структуре образцов, однако разрешающая способность микротомографа оказалась недостаточной для визуализации клеточного компонента. Наиболее информативным было признано гистологическое исследование, обнаружившее высокую степень колонизации лунок. При исследовании образцов контрольной группы, не подвергавшихся лазерному травлению, была обнаружена лишь поверхностная колонизация матрикса-носителя. Результаты гистологического исследования приведены на Рисунке 3.11.



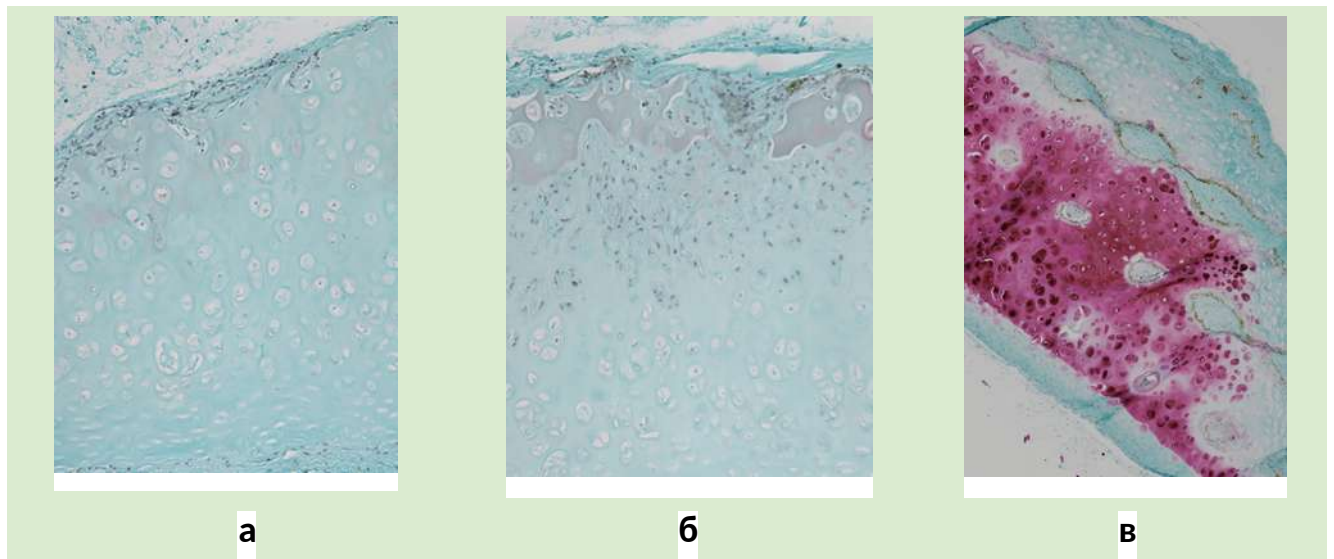
Примечание. (а) образец хрящевой ткани трахеи, не подвергнутый лазерному травлению (контрольная группа) увеличение $\times 200$; (б) назальные хондроциты в лунках ТИК хрящевой ткани трахеи человека, увеличение $\times 200$; (в) ТИК хрящевой ткани трахеи человека, общий вид, увеличение $\times 100$

Рисунок 3.11. – Гистологическое исследование поперечных срезов (перпендикулярно плоскости перфорации), световая микроскопия, окраска: Сафранин-О и гематоксилин

Таким образом, матрикс-носитель с модифицированной микроархитектоникой с одной стороны, сочетает в себе свойства естественной хрящевой ткани человека, и, с другой стороны, имеет специальные особенности, делающие его доступным для быстрой ревитализации клеточным компонентом реципиента. Результаты гистологического исследования убедительно доказывают возможность эффективной и быстрой ревитализации таких матриксов-носителей с колонизацией лунок матрикса при сохранении исходного межклеточного вещества хрящевой ткани.

3.3.3. Исследование качества ревитализации и биосовместимости тканеинженерной конструкции после имплантации *in vivo* в гетеротопическую позицию

Гистологическое исследование образцов тканеинженерной конструкции спустя 8 недель после имплантации в гетеротопическую позицию (подкожно) безтимусным гипоиммунным мышам позволило визуализировать более интенсивную колонизацию лунок клеточным компонентом. Результаты гистологического исследования тканеинженерной конструкции после ревитализации *in vitro* и через 8 недель после имплантации ревитализированной конструкции приведены на Рисунке 3.12. На продольных срезах (Рисунок 3.12в) отмечается присутствие клеток на глубине более 600 мкм в толще матрикса-носителя, что вдвое превышает глубину лунок, сформированных при лазерном травлении, и является свидетельством интенсивной клеточной миграции за пределы лунок. В контрольном образце хрящевой ткани трахеи человека, не подвергнутой лазерному травлению, клетки остаются на поверхности (Рисунок 3.12а)



Примечание. (а) продольный срез экспланта контрольного фрагмента; (б) продольный срез экспланта ТИК; (в) поперечный срез экспланта ТИК

Рисунок 3.12. – Гистологическое исследование контрольного образца и экспланта ТИК хрящевой ткани трахеи человека после 8 недель культивирования *in vivo*, Окраска Сафранин-О и Гематоксилин, световая микроскопия, общий вид, увеличение $\times 100$

На Рисунке 3.13 приведена прицельная визуализация поперечных срезов слепых лунок под более высоким увеличением для образцов ТИК и неревитализированных матриксов носителей после 8 недель культивирования *in vivo* (Рисунок 3.13). Поры ТИК оказались полностью заполнены новообразованной хрящеподобной тканью (Рисунок 3.13, а, б), в отдельных лунках, образованных лазерным травлением, отмечается наличие окрашенных сафранином гликозаминогликанов, синтезированных назальными хондроцитами. В то же время лунки матриксов-носителей, не подвергнутых предварительной ревитализации *in vitro*, частично заполнены рыхлой соединительной тканью, при этом отдельные лунки остались пустыми (Рисунок 3.13в).

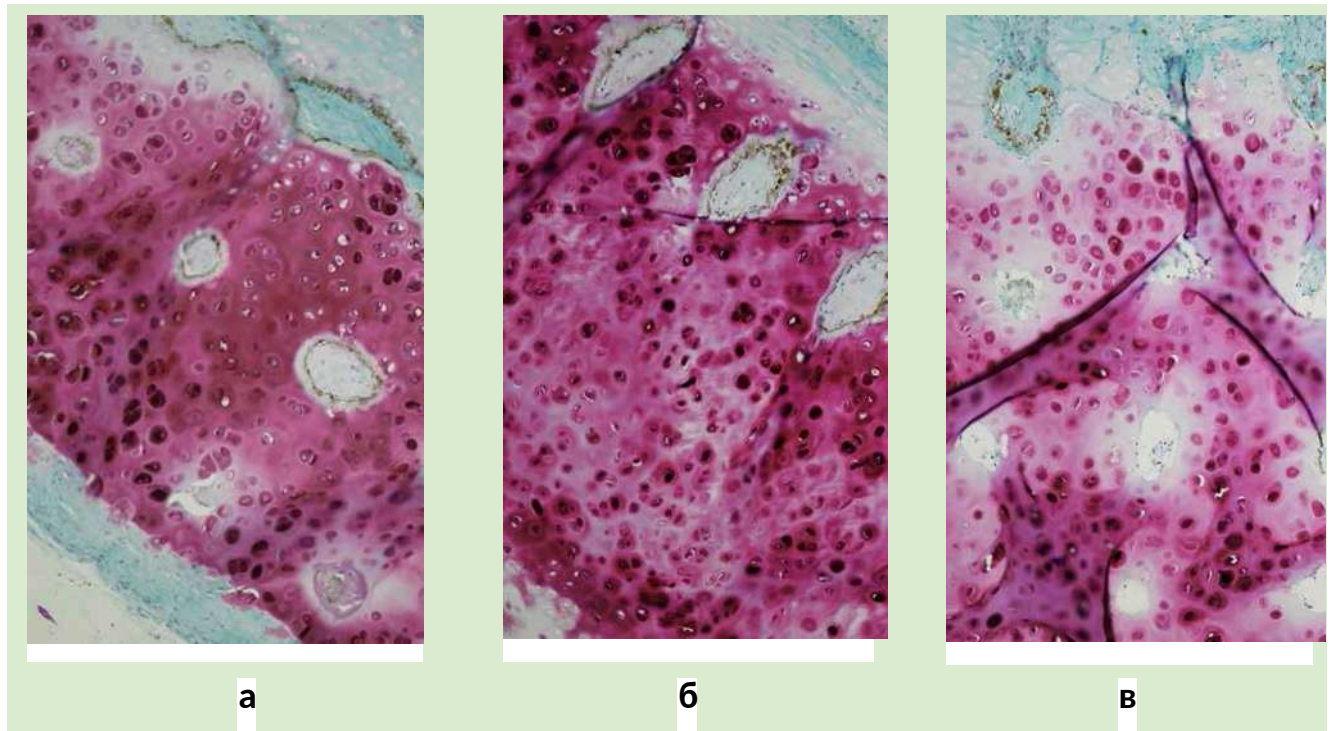
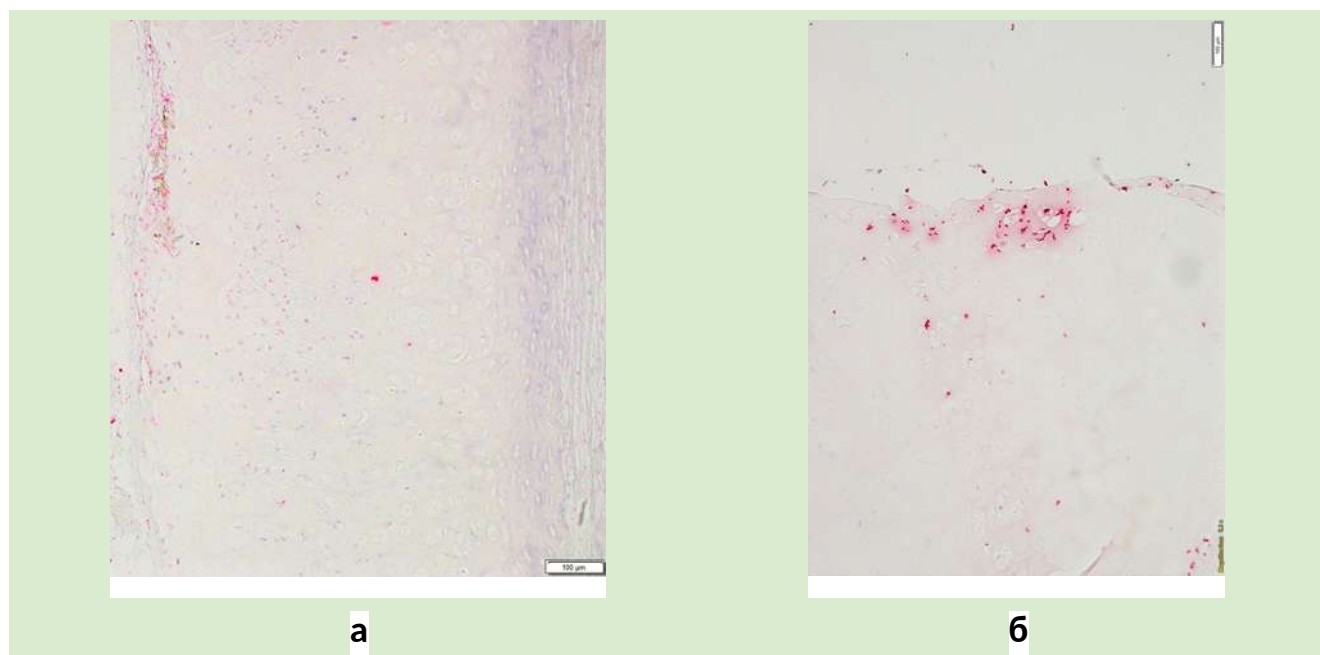


Рисунок 3.13 – Гистологическое исследование эксплантов ТИК хрящевой ткани трахеи человека и ее матрикса-носителя после 8 недель культивирования *in vivo*, Окраска Сафранин-О и Гематоксилин, световая микроскопия, увеличение $\times 200$: (**а** и **б**) поперечные срезы экспланта ТИК, (**в**) поперечный срез экспланта матрикса носителя

При окраске ДНК методом биотинилированной положительной контрольной олиго-пробы (ALU) ядра клеток в толще эксплантированной конструкции окрашиваются красным цветом, соответствующим положительной реакции, что позволяет идентифицировать их как человеческие. Результаты ALU-пробы приведены на Рисунке 3.14.



Примечание. (а) продольный срез экспланта ТИК, (б) продольный срез контрольного фрагмента девитализированной хрящевой ткани трахеи человека

Рисунок 3.14 – Гистологическое исследование контрольного образца и экспланта ТИК хрящевой ткани трахеи человека после 8 недель культивирования *in vivo*, Окраска клеточных ядер методом биотинилированной контрольной олиго-пробы (ALU), световая микроскопия, Увеличение $\times 100$

3.3.4. Исследование эффективности тканеинженерной конструкции при имплантации *in vivo* в ортотопическую позицию с закрытием дефекта стенки трахеи

МСКТ шеи и органов грудной клетки выполненное лабораторным животным (кроликам, $n = 2$) через 4 недели как после имплантации ТИК, так и ее матрикса-носителя в ортотопическую позицию (дефект переднебоковой стенки трахеи), не выявило признаков релевантного стенозирования просвета трахеи или миграции импланта. На Рисунке 3.15 видно, что просвет трахеи кролика после имплантации ТИК (Рисунок 3.15а) остается неизменным на всем протяжении до бифуркации. У кролика, перенесшего имплантацию неревитализированного матрикса-носителя (Рисунок 3.15б), отмечается незначительный стеноз просвета трахеи в области дистального анастомоза, не превышающий одной трети диаметра трахеи выше и ниже стенозированного участка.

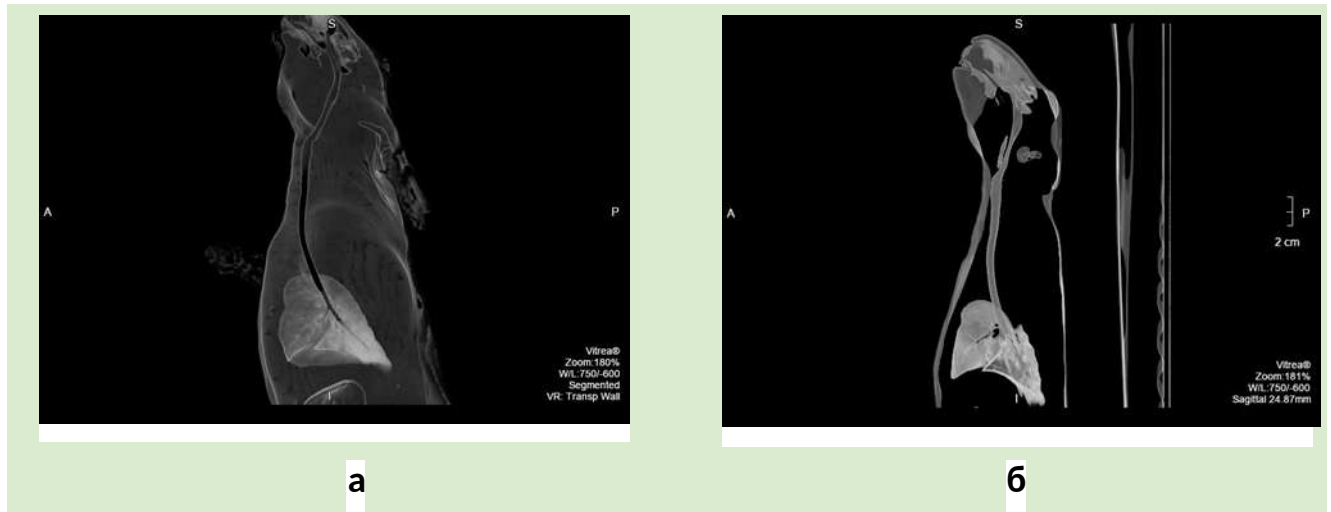
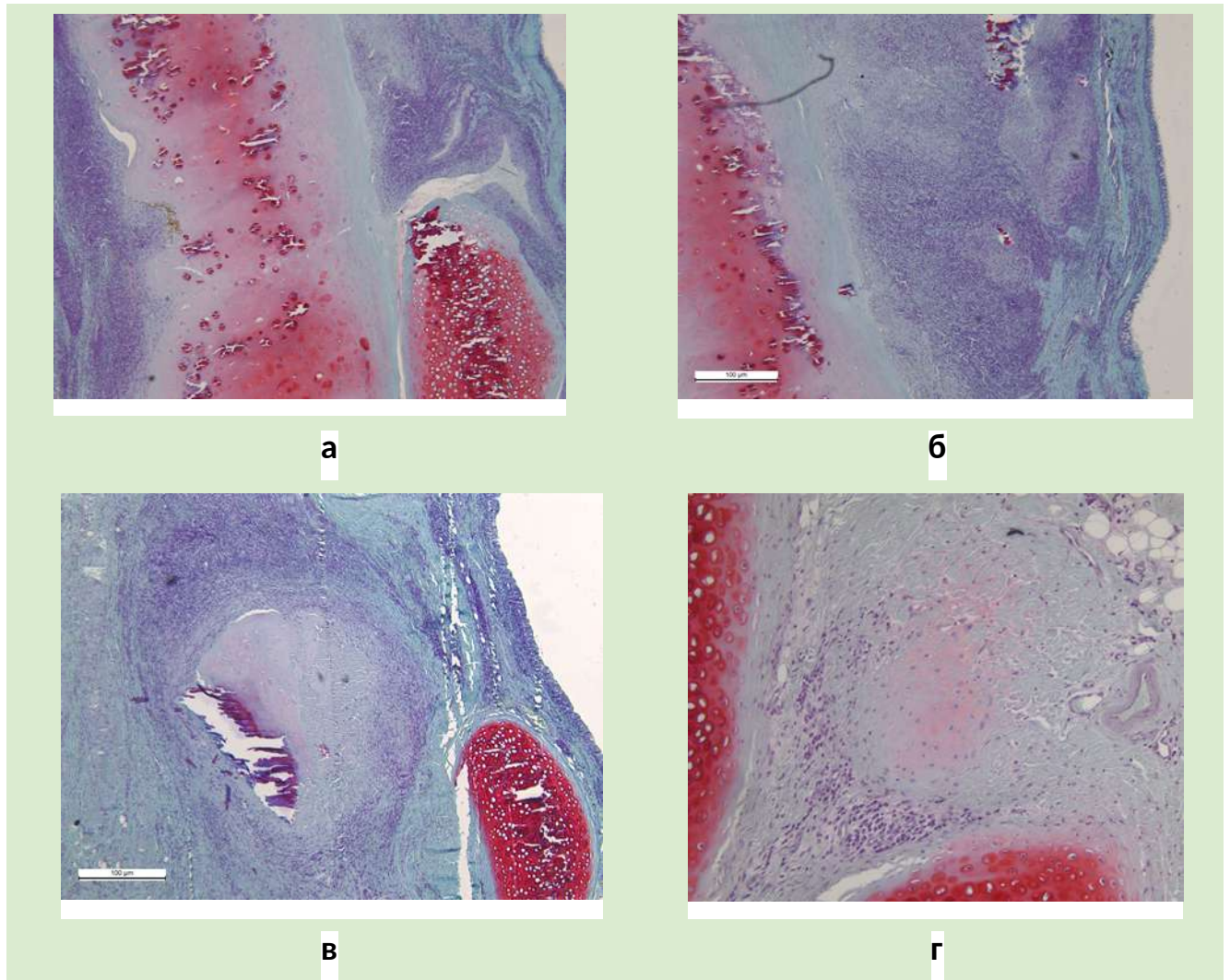


Рисунок 3.15. – МСКТ головы, шеи и грудной клетки кролика через 4 недели после операции: (а) состояние после имплантации ТИК; (б) состояние после имплантации матрикса-носителя

Последующее гистологическое исследование образцов тканеинженерной конструкции (опытная группа, $n = 4$) и матриксов-носителей (контрольная группа, $n = 4$) спустя 8 недель после имплантации в ортотопическую позицию кроликам позволило визуализировать интенсивную колонизацию лунок клеточным компонентом в обеих группах животных. При этом в отличие от образцов контрольной группы, в области имплантации ТИК отмечались локальные очаги формирования хрящевой ткани с синтезом окрашенного сафранином межклеточного вещества. На стороне, соответствующей внутреннему просвету трахеи, во всех образцах визуализируется слизистая оболочка, характеризующаяся наличием бокаловидных клеток и реснитчатых клеток мерцательного эпителия. Результаты гистологического исследования эксплантов приведены на Рисунке 3.16.



Примечание. (а) общий вид матрикса-носителя в ортотопической позиции, продольные (в сагиттальной плоскости) срезы экспланта (б) слизистая оболочка в просвете трахеи, покрывающая матрикс-носитель (в) участок ТИК в ортотопической позиции (г) окрашенный сафранином в светло-розовый цвет очаг формирования новой хрящевой ткани в области имплантации ТИК

Рисунок 3.16. – Гистологическое исследование эксплантов ТИК хрящевой ткани трахеи и ее матрикса-носителя через 8 недель после ортотопической имплантации, окраска Сафранин-О и Гематоксилин, световая микроскопия

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Достаточность использованных в работе материалов и методов для решения поставленных задач

Активный рост числа публикаций и большое число выдающихся работ, посвященных реконструкции дыхательных путей тканеинженерными трансплантатами, свидетельствует о высокой актуальности данной проблемы. Использование ТИК для восстановления трахеи представляет новейший раздел в современной экспериментальной медицине и торакальной хирургии, однако внедрение данных технологий в клиническую практику должно предваряться изучением патофизиологических процессов, сопровождающих реконструктивную операцию и приживление трансплантата. Создание биологически и физиологически совместимой ТИК трахеи, пригодной для использования в клинической практике, требует системного понимания *патофизиологической сущности восстановительной операции* (Пирогов Н. И., 1852; цит. по Лопухин Ю., 1971). Клинические исследования с имплантацией ТИК трахеи, проведенные ранее, не всегда оказывались успешными, однако позволили сформировать основу для существующих подходов к применению технологий тканевой инженерии для реконструкции трахеи (Jungebluth P., 2012).

Создание ТИТ и отдельных ТИК трахеи представляет высокий научно-практический интерес вследствие наличия общих проблем при создании тканеинженерных трансплантатов эпителиальных органов и нерешенной на сегодняшний день клинической проблемы радикального лечения пациентов с постинтубационными протяженными стенозами трахеи.

Известны современные подходы к решению проблемы создания оптимальных синтетических скаффолдов для ТИ трахеи с использованием технологий трехмерной печати (Jung S., 2016). Исследователи, однако, не пытались создать ТИК или ТИТ на его основе и ограничились имплантациями неревитализированного матрикса-носителя *in vivo*. Известные на сегодняшний день примеры успешного применения тканеинженерных трансплантатов для радикального хирургического лечения протяженных рубцовых стенозов и

врожденных патологий трахеи в клинике ограничиваются использованием конструкций на основе кадаверных децеллюляризированных скаффолдов и мезенхимальных стволовых клеток (Berg M., 2012., Gonfiotti A., 2014; Hamilton, N., 2015).

Назальные хондроциты человека имеют существенное преимущество перед МСК, и были выбраны в настоящем исследовании в качестве клеточного источника для ревитализации матрикса-носителя исходя из высокого пролиферативного потенциала и их способности синтезировать компоненты межклеточного вещества.

Однако назальные хондроциты не способны к самостоятельной колонизации глубоких слоев девитализированной хрящевой ткани и возможности ревитализации ими матрикса-носителя на основе кадаверного материала ограничиваются плотностью его межклеточного вещества. Таким образом, применение клеток данного типа требует предварительных модификаций естественной структуры хрящевой ткани с формированием канальцев или других путей для клеточной миграции (Lehmann J., 2019).

Научная группа под руководством Yong Xu (2017) из Университета Шанхая (Китай) предложила новейшее решение для создания ТИК хрящевой ткани трахеи. При создании ТИК хрящевой ткани трахеи кролика использовалась лазерная перфорация в сочетании с детергент-энзиматической децеллюляризацией. В эксперименте была продемонстрирована ревитализация матрикса-носителя хондроцитами ушного хряща кролика *in vitro* и при эктопической имплантации *in vivo* безтимусной мыши (Xu Y., 2017). Однако хрящевая ткань колец трахеи кролика значительно тоньше таковой у человека, что упрощает процедуру децеллюляризации, а авторы исследования не пытались адаптировать данную технологию для перфорации хрящевой ткани трахеи человека. Кроме того, предложенная технология предполагает формирование широких неглубоких слепых лунок диаметром от 250 мкм на большом удалении друг от друга – около 1 мм. Отсутствуют результаты ортотопических аллогенных трансплантаций указанной ТИК. Приведенные выше замечания не позволяют

рассматривать данную ТИК как полноценный прототип тканеинженерного трансплантата, пригодного для использования в рамках клинических исследований. Все более очевидной стала необходимость проведения исследований ТИК, полученных с использованием тканей и клеток человека. Возникает необходимость адаптации и усовершенствования новейших современных технологий, чтобы сделать возможным создание на их основе ТИК для решения проблем хирургии трахеи в клинике. Данные вопросы были решены в настоящей научно-исследовательской работе.

Данное исследование объединяет преимущества методов предложенных в исследованиях Kojima в 2014 г. (Kojima K. et al., 2014) и принципиально новой, не имеющей аналогов технологии, предложенной Yong Xu в 2017 г. Прецизионность лазерной перфорации хрящевой ткани трахеи была многократно повышена за счет уменьшения диаметра перфораций, увеличения их глубины с одновременным уменьшением расстояния между ними, не допуская, однако, слияния лунок. В данной работе проведена оценка биологической совместимости и биodeградации предложенных ТИК трахеи. Настоящая работа сочетает преимущества эффективной биоревитализации хрящевых тканей *in vitro* и *in vivo* при гетеротопической имплантации, не ограничиваясь при этом последней. Экспериментальные исследования *in vivo* с ортотопическими имплантациями впервые позволили оценить физиологическую совместимость и эффективность ТИК, основанных на хрящевой ткани, подвергнутой лазерному травлению, для закрытия критических дефектов трахеи. Таким образом, инструментарий, использованный в настоящей работе, является достаточным для решения всех поставленных задач в соответствии с выбранными специальностями.

4.2. Систематизация существующих подходов к созданию тканеинженерной конструкции трахеи и восстановительных операций

Детальный анализ эффективности, а также краткосрочных и долгосрочных осложнений, возникающих при реконструктивных и заместительных операциях на трахее, необходим при разработке оптимального дизайна ТИК трахеи, использование которой позволит избежать возникновения рассматриваемых

осложнений хирургического лечения. В последние годы все чаще встречаются высказывания в пользу мультидисциплинарного подхода, включающего изучение биологических механизмов, для анализа причин развития осложнений и поиска новых методов лечения (Клабуков И., 2018).

Наибольшего успеха в обобщении накопленного опыта использования различных материалов в заместительных операциях на трахее удалось добиться Hermes и Grillo (2002), в которой все используемые материалы разделялись на пять категорий: инородные материалы, девитализированные ткани, аутогенные ткани, тканеинженерные конструкции и трансплантация трахеи. Технологии тканевой инженерии для создания трансплантата трахеи Grillo характеризует как «многообещающие». Так как большинство обзорных работ, посвященных реконструктивной хирургии и заместительным операциям на трахее выполнены клиницистами, они имеют преимущественно прикладную клиническую направленность (Kucera K., 2007). Основные требования к имплантатам для реконструктивной хирургии трахеи были впервые сформулированы Neville в 1990 г. В соответствии с ними имплантаты должны обладать соответствующими механическими характеристиками для предотвращения коллапса трахеи, создавать условия для эпителиального роста и регенерации слизистой оболочки, быть совместимыми с организмом реципиента и готовыми к имплантации в кратчайшие сроки (Neville W., 1990). ТИК трахеи, представляющие собой живые комплексные структуры, основанные на аутогенных (собственных) клетках реципиента, идеально соответствуют вышеперечисленным требованиям. В то же время на сегодняшний день отсутствует единое мнение об идеальном материале для изготовления основы конструкции и источнике клеток. Gerek называет реберный хрящ «золотым стандартом» среди материалов для ларинготрахеальной реконструкции (Gerek M., 2001). Однако другие исследователи указывают на ряд опасных осложнений, которые могут сопровождать хирургическую процедуру забора реберной хрящевой ткани (Ohara K., 1997).

На сегодняшний день ряд известных примеров успешного применения тканеинженерных трансплантатов для радикального хирургического лечения

протяженных рубцовых стенозов в клинике ограничивается использованием ТИК на основе органических децеллюляризированных скаффолдов и аутогенных МСК, выделенных из моноклеарной фракции костного мозга. Процедура получения образца красного костного мозга пациента представляется относительно безопасной, однако и она может быть сопряжена с рядом локальных осложнений, а в отдельных случаях – тяжелыми раневыми инфекциями и сепсисом (Morotti A., 2016).

Таким образом, в качестве не менее важной характеристики, следует учитывать доступность донорской области и простоту и безопасность забора биоматериалов для самого пациента.

ТИК, созданная в результате настоящего исследования, сочетает в себе все возможные преимущества ТИК, предложенных ранее. ТИК, основанная на матриксе-носителе из кадаверного обесклеточенного хряща трахеи и ревитализированная собственными назальными хондроцитами реципиента, отвечает всем основным требованиям, предъявляемым к имплантатам для реконструктивной хирургии трахеи. Низкая иммуногенность конструкции обеспечивается аутогенными клеточными материалами, а доступность и простота биопсии хрящевой ткани носовых раковин сводят к минимуму риски локальных осложнений. Высокая скорость пролиферации назальных хондроцитов и их способность активно синтезировать компоненты хрящевого межклеточного матрикса лежит в основе быстрой ревитализации ТИК и позволяет подготовить ее к имплантации реципиенту в максимально сжатые сроки.

4.3. Свойства и характеристики матриксов-носителей для тканеинженерной конструкции

Оценка качества получения биологически и физиологически совместимых матриксов для создания ТИК была основана на проведении экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*.

Первые исследования биосовместимости девитализированных тканей и результаты их имплантации *in vivo* были проведены еще в 1959 г. Ф. М. Лазаренко (Лазаренко Ф., 1959). В современной тканевой инженерии девитализация широко

применяется как один из основных этапов подготовки матриксов-носителей на основе естественных тканей и органов человека и животных. Так, повторяющиеся циклы «замораживание – оттаивание» использовались для получения децеллюляризованных хрящей в работах Roth и соавт. (2017) и Chang и соавт. (2014), которые показали пригодность данного метода для получения матриксов, предназначенных для их дальнейшей витализации клетками. Однако в настоящем исследовании было предложено отказаться от детергент-энзиматической обработки для тканей, подвергнутых лазерному травлению, в целях максимального сохранения межклеточного вещества матрикса-носителя. Более того, при девитализации фрагмента нативной трахеи кролика большая часть клеток из объема трахеального матрикса также была удалена в циклах замораживания-оттаивания, что, по всей видимости, благоприятно сказалось на снижении иммунного ответа на имплантат.

При этом если ранее для получения девитализированного матрикса ТИК использовались протоколы с 5-кратными циклами замораживания – оттаивания (Bader A., 2010), то использование 3-кратного цикла в настоящей работе также оказалось эффективно для получения матрикса-носителя на основе трахеи кролика.

Работа с тканями человеческого трупного донора на последующих этапах сформировала необходимость адаптировать разработанный протокол с учетом более высокой толщины и плотности хрящевой ткани человека. Кроме того, экспериментальные исследования, выполненные в последние годы (Xu Y. et al., 2017), доказали возможность успешной лазерной перфорации хрящевой ткани необходимой толщины, потенциально открывающей пути для более глубокого и интенсивного ферментативного воздействия, что заставило пересмотреть вопрос о необходимости агрессивной децеллюляризации образцов до выполнения лазерной перфорации.

Следствием лазерного травления становится существенное увеличение площади поверхности матрикса-носителя. Так, при использовании в работе фрагментов хрящевых матриц толщиной 1 мм в режиме несквозной лазерной

перфорации (лазерного травления) с глубиной лунок 0,3 мм и диаметром 0,1 мм и плотностью 4 отверстия-лунки на 0,1 мм² площади, удельная площадь поверхности материала, рассчитываемая как отношение площади поверхности к объему материала, увеличилась бы с (1) до (2):

$$\frac{S}{V} = \frac{2 \times 0,1 \text{ мм}^2}{1 \text{ мм} \times 0,1 \text{ мм}^2} = 2 \text{ мм}^{-1}, \quad (1)$$

$$\frac{S}{V} = \frac{0,1 \text{ мм}^2 + 4\pi \times 0,1 \text{ мм} \times 0,3 \text{ мм}}{1 \text{ мм} \times 0,1 \text{ мм}^2 - 4\pi \times (0,1/2)^2 \times 0,3 \text{ мм}} = 5,3 \text{ мм}^{-1}. \quad (2)$$

То есть в случае применения лазерного травления удельная площадь материала увеличивается в 2,6 раза. Подобное изменение физических параметров матрикса при использовании стандартных общепринятых методов агрессивной детергент-энзиматической децеллюляризации может привести к существенному изменению механических характеристик материала, сопровождающееся его разрушением в процессе дальнейшей обработки и заселения клетками.

В ходе проведения предварительных экспериментальных исследований (“proof-of-principle study”) была рассмотрена возможность формирования отдельных рядов лунок с использованием миллисекундных лазерных импульсов. Расстояние между лунками в одном ряду было принято равным диаметру лунки. Расстояние между отдельными рядами составило 1,5 мм. Основной задачей данного предварительного исследования являлось принципиальное сохранение интактной хрящевой ткани на поверхности образца после лазерной перфорации.

Дальнейшие экспериментальные исследования подтвердили техническую возможность формирования более высокой плотности перфорации слепыми лунками без их слияния или разрушения поверхности образца (Рисунок 4.1). В связи с тем, что качество ревитализации матриксов-носителей зависит от плотности перфорации, максимально высокая из возможных плотность покрытия поверхности лунками была использована для дальнейших исследований.

Экспериментально было установлено, что в заданном режиме импульсного излучения (длительность импульса 0,25 мс) в полученных образцах матрикса образуются поры диаметром 100 мкм и глубиной 300 мкм. Критическим параметром являлся диаметр поры, уменьшить который, используя иные режимы излучения CO₂ лазера, оказалось невозможно. Данные параметры модификации материала были приняты достаточными для использования в дальнейшем в целях модификации матриц-носителей на уровне микроархитектоники с целью обеспечения как условий для заселения хондроцитами объема материала, так и минимизации удаленного из материала объема межклеточного вещества для обеспечения условий для восстановления объема коллагена заселенными на матрикс клетками.



Примечание: (а) вид сверху; (б) вид сбоку на поперечном срезе

Рисунок 4.1. – Девитализированная хрящевая ткань трахеи человека, подвергнутая лазерной перфорации с формированием слепых лунок (лазерное травление) с высокой плотностью покрытия поверхности образца. Макросъемка, $\times 5$

Немаловажным оказалось и то, что лазерное травление позволило сохранить состояние межклеточного вещества в образцах, микроскопически соответствующее таковому в нативной хрящевой ткани трахеи человека с сохранением естественной микро-архитектоники хряща без существенного (визуально наблюдаемого) снижения содержания гликозаминогликанов. Применение такого метода аккуратной обработки материала позволяло сохранить его нативные механические свойства и структуру для проведения дальнейших манипуляций.

4.4. Ревитализация матриксов-носителей клеточными культурами

Отработанные ранее методы эффективного заселения матриксов ТИК в режимах статичного культивирования показали свою пригодность для создания ТИТ кролика с двухслойным клеточным покрытием. Удалось получить образцы ТИТ кролика, на основе девитализированной аллогенной трахеи, сингенных МСК КМ и КЛЭ. Наличие жизнеспособных клеток на внутренней и внешней поверхностях матрикса-носителя, подтвержденное методом конфокальной

микроскопии, указывает на успешную клеточную адгезию к поверхности матрикса носителя в ходе ревитализации.

Для суждения о качестве ТИК на основе плотной хрящевой ткани человека, имеющей значительную толщину, недостаточно оценки одной только клеточной адгезии на поверхности матрикса-носителя. Гистологические исследования выявили интенсивную колонизацию лунок, полученных в результате лазерного травления, назальными хондроцитами *in vitro*. Результатом ревитализации хрящевой ткани трахеи стала ТИК содержащая хрящевые клетки как в поверхностных, так и в более глубоких структурах матрикса на глубине до 400 мкм. Наши исследования показали, что воздействие провоспалительного цитокина, имитирующего воспалительный процесс в эксперименте, позволяет существенно ускорить данную миграцию и повысить ее эффективность (Барановский Д., 2019). Однако ее использование при изготовлении ТИК было признано нецелесообразным ввиду активного разрушения межклеточного вещества.

4.5. Биологическая и физиологическая совместимость и эффективность тканеинженерной трахеи и тканеинженерной конструкции хрящевой ткани

4.5.1. Биологическая и физиологическая совместимость и эффективность тканеинженерной трахеи кролика

Биологическая и физиологическая совместимость и эффективность ТИТ кролика оценивалась по результатам КТ шеи и грудной клетки кролика через 3 месяца после имплантации и результатам анализа экспоната через 6 месяцев после ортотопической имплантации.

По отсутствию нейтрофилов и эозинофилов в зонах эпителия и подслизистого слоя окружающих ТИТ тканей можно сделать вывод, что имплантат не обладал токсическим воздействием на ткань реципиента. Несмотря на незначительное сужение просвета трахеи в области имплантации, отмеченное на КТ с 3D-реконструкцией, стенозирования трахеи не наблюдалось. Сужение просвета может быть объяснено наличием шовного материала в просвете трахеи и незначительной деформацией ее тонкой стенки в области микрохирургического

шва. Сужение, тем не менее, не оказало никакого негативного эффекта на функцию дыхания: у животных не отмечалось признаков дыхательной недостаточности. Наблюдение за животными в послеоперационном периоде не выявило повышения ЧДД или падения сатурации.

Гистологические исследования эксплантатов через 6 месяцев после операции не выявили признаков инфекции, некроза или хронической воспалительной реакции. По отсутствию хронической воспалительной реакции можно сделать вывод, что специфический иммунный ответ на ТИТ также не развивался. В подслизистом слое наблюдалось большое количество сосудов и капилляров, что говорит о хорошей васкуляризации конструкции. На основании полученных результатов гистологического исследования ТИТ и окружающих имплантат тканей можно сделать вывод, что созданная конструкция обладает адекватной биосовместимостью, хорошо эпителизируется, васкуляризируется и интегрируется в структуру трахеи животного-реципиента.

4.5.2. Биологическая совместимость тканеинженерной конструкции хрящевой ткани трахеи человека

Биологическая совместимость ТИК хрящевой ткани трахеи человека оценивалась по результатам подкожной имплантации гипоимунным безтимусным мышам при гистологическом исследовании эксплантата через 8 недель после операции.

С целью оценки качества ревитализации все эксплантаты подвергались гистологическому исследованию с окраской гематоксилином и сафранином-О. Отсутствие клеток в толще матриксов-носителей эксплантатов контрольной группы, не подвергнутых лазерному травлению, свидетельствует о неспособности назальных хондроцитов к колонизации нативной хрящевой ткани трахеи как *in vitro* так и *in vivo*.

По наличию большого количества клеток в толще матрикса-носителя ТИК и более интенсивной полонизации лунок после 8 недель культивирования *in vivo* в сравнении с образцами, подвергнутыми анализу после культивирования *in vitro*, можно судить о способности назальных хондроцитов выживать в микролунках

матрикса-носителя и завершать формирование ТИК уже после имплантации. Отсутствие наблюдаемого при гистологическом исследовании свободного просвета в центре лунки-перфорации может являться признаком клеточной пролиферации и синтеза межклеточного вещества назальными хондроцитами.

Гистохимическое исследование с окраской методом ALU-пробы позволяет идентифицировать клетки в ТИК как человеческие и исключает возможность замещения клеточного компонента ТИК собственными клетками мыши. Признаков разрушения собственного межклеточного вещества донорской девитализированной хрящевой ткани при этом не наблюдалось. Во всех исследуемых образцах матрикс-носитель ТИК сохранял свою форму и микроархитектонику.

Предложенные в настоящей части работы методы получения биологически и физиологически совместимой ТИК хрящевой ткани трахеи человека могут быть использованы в качестве элементов для разработки и создания ТИК дыхательных путей человека и моделей хрящевых тканей.

4.6. Эффективность применения тканеинженерных конструкций различных типов в условиях экспериментальной хирургической модели критического дефекта трахеи

Оценка биологической совместимости различных ТИК в эксперименте *in vivo*, как правило, ограничивается методом гетеротопической (чаще всего подкожной) имплантации мелким лабораторным животным. Техническая простота исполнения, воспроизводимость метода и достоверность получаемых результатов сделали его методом выбора в современной тканевой инженерии. В качестве экспериментальной модели для такой имплантации в настоящем исследовании были выбраны бестимусные мыши, в связи с возможностью имплантации им ксеногенных материалов без возникновения риска развития реакции отторжения трансплантата. Однако гетеротопическая имплантация не позволяет оценить физиологическую совместимость а также эффективность ТИТ, отдельных типов ТИК или материалов.

В качестве экспериментальной модели для ортотопической имплантации ТИТ и ТИК предпочтение было отдано кроликам, так как предварительные исследования, выполненные на мышах и крысах в рамках отработки протокола оперативного вмешательства, выявили существенные ограничения предельно допустимого размера конструкции и невозможность имплантации ТИК всех необходимых типов в миниатюрную стенку трахеи мелких лабораторных животных с соблюдением заданной толщины и ширины ТИК.

Все ТИТ или ТИК имплантировались в шейный отдел трахеи. Выбор данной локализации имеет ряд неоспоримых преимуществ, вытекающих из анатомии и топографии трахеи:

- хирургический доступ к шейному отделу трахеи является наиболее простым технически и наименее травматичным, т. к. не требует выполнения стернотомии;
- операция становится возможной без осуществления ИВЛ;
- сокращается продолжительность операции;
- снижается риск послеоперационных осложнений.

При этом имплантация всех конструкций производилась в область переднебоковой стенки без выполнения циркулярной резекции трахеи с целью сокращения времени послеоперационной реабилитации животного. Кроме того, замещение мягкой задней стенки трахеи хрящевой тканью ТИК нарушало бы естественную архитектуру органа и затрудняло бы анализ результатов эксперимента.

С целью адекватной оценки эффективности тканеинженерной конструкции при замещении стенки дыхательных путей на кроликах требовалось сформировать такие условия, при которых самопроизвольное восстановление целостности трахеи животного было бы невозможным. Для этого необходимо было удалить существенную часть переднебоковой стенки трахеи с образованием критического дефекта.

Под критическим дефектом понимается дефект ткани или органа, не способный нормально зажить без пластического закрытия или ушивания (Zhang

L., 2007). Исходя из нашего практического опыта, для кроликов размер критического дефекта трахеи, составляет протяженность более 4 мм (что эквивалентно резекции 4-5 колец трахеи) и ширину более 2 мм. При этом трахеальный дефект должен быть сформирован далее 2-го кольца во избежание повышенного риска развития стеноза трахеи.

Одним из результатов исследования являлось получение достоверных данных о биологической и физиологической совместимости тканеинженерных конструкций на основе матриксов различного происхождения при закрытии критического дефекта трахеи на модели экспериментального животного.

Результат достигался за счет разработки способа оценки жизнеспособности, включающего иссечение части стенки трахеи экспериментального животного между 2-м и 7-м кольцами с формированием критического дефекта стенки трахеи размером не менее 2×4 мм, фиксацию тканеинженерной конструкции в области дефекта, по истечении 1 или 3 месяцев после фиксации тканеинженерной конструкции проведение исследования трахеи лучевым методом (КТ) для оценки степени сужения просвета трахеи, по истечении 2 или 6 месяцев (в зависимости от типа используемой конструкции) проведение постмортального гистологического и иммуногистохимического исследования эксплантированной тканеинженерной конструкции, определение по результатам исследований диагностических признаков, приведенных в параграфе 2.12 главы «Материалы и методы».

Тканеинженерная трахея кролика представляла собой девитализированный трахеальный матрикс, двухслойно заселенный мезенхимальными стромальными клетками костного мозга и эпителиоцитами легкого кролика породы «Серый Великан». Спустя 3 мес. после имплантации тканеинженерной конструкции животным проводили мультиспиральную компьютерную томографию под седацией. Для наглядной оценки состояния дыхательных путей и просвета трахеи создавали 3D-модель дыхательных путей в формате STL при помощи метода волюметрического сегментирования (см. главу 2 «Материалы и методы»). Сужение просвета трахеи в данном случае у каждого из трех прооперированных

животных не наблюдалось, поэтому физиологическая совместимость имплантата признана удовлетворительной ($\Phi_3 = 1$). Иммуногистохимическое исследование с окраской антителами к СКРan и кадгеринам (CDH) выявило, что внутренняя поверхность тканеинженерной конструкции полностью эпителизировалась ($\Pi_3 = 1$). Подсчет сосудов в подслизистой проводился путем подсчета сосудов на 5 различных окрашенных гематоксилин-эозином препаратах тканеинженерной конструкции, что составило 34 ± 4 мм⁻² ($B_c = 1$). Таким образом, итоговое рассчитанное значение общей оценки эффективности конструкции (рассчитываемое как произведение отдельных диагностических критериев) составило $\Xi_{сб} = 1$. Используемая тканеинженерная конструкция трахеи признана способной к эффективному замещению стенки трахеи при имплантации в ортотопическую позицию.

Тканеинженерная конструкция хрящевой ткани трахеи человека представляла собой девитализированный хрящевой матрикс, подвергнутый лазерному травлению, и заселенный назальными хондроцитами кролика породы «Серый Великан». Спустя 1 мес. (4 недели) после имплантации тканеинженерной конструкции одному случайно выбранному животному проводили мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) под седацией. Сужение просвета трахеи в данном случае составило 15% (т. е., тем не менее, не превысило 30%), поэтому физиологическая совместимость имплантата признана удовлетворительной ($\Phi_3 = 1$). Гистологическое исследование с окраской сафранином-О и гематоксилином выявило, что внутренняя поверхность тканеинженерной конструкции полностью эпителизировалась и покрыта слизистой оболочкой ($\Pi_3 = 1$). Подсчет сосудов в подслизистой проводился аналогично путем подсчета сосудов на 5 различных окрашенных гематоксилин-эозином препаратах тканеинженерной конструкции, что составило 38 ± 2 мм⁻² ($B_c = 1$). Таким образом, итоговое рассчитанное значение общей оценки эффективности конструкции составило $\Xi_{сб} = 1$. Используемая тканеинженерная конструкция трахеи также признана способной к эффективному замещению стенки трахеи при имплантации в ортотопическую позицию.

Таким образом, формирование естественной структуры тканей в пределах тканеинженерной конструкции применительно к ТИК двух различных типов достигалось двумя различными способами:

- 1) непосредственное заселение физиологически совместимого материала соответствующими донорскими клетками;
- 2) обеспечение условий для колонизации материала, клеточной миграции и регенерации.

Несмотря на различия в этапности регенерации при использовании ТИТ и ТИК хрящевой ткани трахеи, их имплантации в ортотопическую позицию лабораторному животному, тем не менее, приводят к сходным результатам (на основе радиологической и гистологической оценки). Однако обеспечение условий для колонизации материала и клеточной миграции методом лазерного травления открыло возможность ревитализации плотной хрящевой ткани трахеи человека, имеющей более высокую толщину по сравнению с таковой у кролика.

Блок-схема регенерации трахеи, отражающая прогнозируемые патофизиологические процессы, протекающие в организме животного при использовании обоих типов имплантатов, приведена на Рисунке 4.2.



Рисунок 4.2. – Прогнозируемые патофизиологические процессы, протекающие в организме животного при использовании ТИК обоих типов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка оптимального биологического протеза трахеи является актуальным направлением в решении проблемы хирургического лечения ряда пациентов с протяженными рубцовыми стенозами органа. Создание эффективной ТИК трахеи на основе кадаверных девитализированных тканей до сегодняшнего дня сталкивалось с существенными затруднениями. Наличие ряда проблем было обусловлено отсутствием оптимальной технологии подготовки плотных хрящевых тканей. Наличие высокоплотного межклеточного вещества в хрящевой ткани трахеи создает сложности как при проведении децеллюляризации, так и при повторном заселении полученного матрикса клетками реципиента.

Для удаления клеточной составляющей нативного органа и подготовки его к заселению новыми клетками могут быть использованы различные методы воздействия на ткань — физические, ферментативные и химические. Недостатком ферментативных и химических методов остается интенсивное разрушение межклеточного вещества, что может привести к потере матриксом-носителем механических характеристик, свойственных естественному хрящу трахеи.

В результате настоящего исследования был разработан дизайн тканеинженерных конструкций трахеи, разработаны и обоснованы требования к методам исследования различных ТИК и основных их компонентов.

Так, нами было показано, что простые матриксы носители для ТИТ кролика могут быть получены без использования специальных методов химической и энзиматической децеллюляризации. Отдельные компоненты ТИТ и ее готовые образцы были исследованы в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что тонкая хрящевая ткань трахеи кролика не требует глубокой ревитализации до имплантации животному-реципиенту. ТИТ, полученные методом поверхностной колонизации матриксов-носителей МСК КМ кролика и КЛЭ доказали свою эффективность при замещении передне-боковой стенки трахеи кролика. Такие ТИТ успешно интегрировались в стенку трахеи, не склонны к деформации и миграции, эффективно поддерживали просвет трахеи, а также обеспечивали формирование эпителиального покрытия внутреннего просвета импланта. Таким

образом, была доказана биосовместимость данной ТИТ, представляющей собой простую трехслойную тканеинженерную конструкцию, и ее эффективность при закрытии критического дефекта стенки трахеи в эксперименте *in vivo*.

В то же время, эффективная ревитализация хрящевой ткани трахеи человека практически невозможна. Назальные хондроциты человека способны к адгезии и пролиферации на поверхности девитализированной хрящевой ткани трахеи, однако глубокая колонизация межклеточного вещества нативной хрящевой ткани трахеи человека невозможна.

Лазерное травление является эффективным способом модификации девитализированной хрящевой ткани, непосредственно формирующей пути для глубокой миграции клеток с возможностью сохранения естественной микроархитектоники хряща в основной толще матрикса, окружающего перфорации. Лазерное травление позволило стандартизировать технологию изготовления матриксов-носителей для тканевой инженерии трахеи, получая образцы носителей с контролируемыми параметрами слепых микроперфораций: заданной глубиной, диаметром лунок и расстоянием между ними. В настоящем исследовании была доказана возможность получения стандартных матриксов-носителей с предсказуемыми параметрами для тканевой инженерии хрящевой ткани трахеи человека.

Девитализированная хрящевая ткань трахеи человека, подвергнутая лазерному травлению, успешно прошла исследования цитотоксичности, была повторно заселена клеточным компонентом (в настоящем исследовании – назальными хондроцитами человека) в статической культуре на полупроницаемой мембране *in vitro*, с получением готовой ТИК в пределах точно прогнозируемых сжатых временных рамок (в течение всего одной недели).

Имплантации таких тканеинженерных конструкций в гетеротопическую позицию *in vivo* на более продолжительный срок (8 недель) существенно увеличивают глубину миграции хондроцитов донора в толщу матрикса, инициируют синтез собственного межклеточного вещества донорскими назальными хондроцитами с объемным заполнением слепых лунок матрикса-

носителя, и, вместе с тем, увеличивают эффективность и качество ревитализации ТИК. Таким образом, была доказана биосовместимость ТИК хрящевой ткани человека в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

Использование гипоимунных (бестимусных) мышей в качестве экспериментальной модели позволило изучить биосовместимость ТИК и особенности ревитализации *in vivo*, избегая таких осложнений имплантации ксеногенного материала, как острое и хроническое отторжение трансплантата.

Экспериментально-хирургический метод резекции передне-боковой стенки шейного отдела трахеи кролика на протяжении 4–6 колец с формированием критического дефекта является наиболее удобным и универсальным для оценки эффективности имплантации ТИК различных типов в ортотопическую позицию и их жизнеспособности. Метод обеспечивает техническую простоту выполнения хирургического вмешательства с низким риском послеоперационных осложнений, создает возможность имплантации однородных фрагментов различных материалов без замещения задней стенки трахеи неестественной для нее плотной тканью хрящевых матриксов-носителей, позволяет наглядно и достоверно оценить эффективность материалов при непосредственном протезировании части органа. В результате настоящего исследования была доказана эффективность ТИК хрящевой ткани трахеи человека при закрытии критического дефекта стенки трахеи в исследовании *in vivo* с поддержанием постоянного просвета трахеи и формированием эпителиального покрытия внутреннего просвета трахеи в области имплантации.

ВЫВОДЫ

1. Созданная экспериментальная хирургическая модель критического дефекта переднебоковой стенки трахеи может использоваться в доклинических исследованиях для оценки физиологической совместимости и эффективности ТИТ и ТИК хрящевой ткани трахеи при ортотопической имплантации. Модель позволяет оценить эффективность конструкций на основе оценки диаметра

просвета трахеи в области имплантации, качества эпителиального покрытия и васкуляризации импланта.

2. ТИТ лабораторных животных могут быть успешно получены методом адгезии МСК КМ и КЛЭ к девитализированной донорской ткани.

3. Имплантация ТИТ на основе девитализированной трахеи кролика, сингенных МСК КМ и КЛЭ в критический дефект стенки трахеи кролика не вызывает отторжения и не приводит ни к рубцовому стенозу трахеи, ни к трахеомалации, ни к миграции или деформации ТИТ в течение шести месяцев.

4. Создание ТИК хрящевой ткани трахеи человека требует разработки и проведения специальной модификации архитектоники хрящевой ткани. Модификация хрящевой ткани трахеи человека методом лазерного травления приводит к формированию слепых лунок на ее поверхности, увеличивает площадь поверхности матрикса-носителя и непосредственно формирует пути для клеточной миграции и адгезии с формированием ТИК.

5. Матрикс-носитель на основе девитализированной хрящевой ткани трахеи человека может быть ревитализирован *in vitro* при заселении назальными хондроцитами человека в течение 7 суток.

6. Культивирование *in vivo* в условиях подкожной имплантации в течение 8 недель повышает эффективность ревитализации матрикса клеточной культурой по сравнению с заселением клетками *in vitro*.

7. Полученная ТИК хрящевой ткани трахеи человека соответствует требованиям, предъявляемым к имплантату трахеи по следующим биологическим параметрам: отсутствие цитотоксичности для стандартных линий клеток; наличие цитосовместимости матрикса-носителя с адгезированными назальными хондроцитами человека; геометрия поверхности матрикса-носителя, позволяющая увеличивать количество прикрепляющихся клеток и немедленно начать ревитализацию поверхностных слоев матрикса-носителя; возможность ревитализации матрикса-носителя с формированием ТИК *in vitro*; обеспечение пролонгированных сроков биорезорбции матрикса-носителя после имплантации; окончательная адекватная ревитализация матрикса-носителя *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДТХ	–	девитализированный трахеальный матрикс
ДЦХ\ДВ Х	–	децеллюризированный \ девитализированный хрящ
ИВЛ	–	искусственная вентиляция легких
КЛЭ	–	клетки легочного эпителия
КМ	–	костный мозг
КТ	–	компьютерная томография
ЛПХТ	–	лазерно-перфорированный хрящ трахеи
МСК	–	мезенхимальные стромальные клетки
МСКТ	–	мультиспиральная компьютерная томография
НХ	–	назальные хондроциты
НЭК	–	назальные эпителиальные клетки
ПИРС	–	постинтубационный рубцовый стеноз
ТИК	–	тканеинженерная конструкция
ТИТ	–	тканеинженерная трахея
ФБС	–	фибробронхоскопия
ХТ	–	хрящ трахеи
DMEM	–	Dulbecco's Modified Eagle Medium

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Амиров, Ф. Ф. Пластика дефектов трахеи и бронхов / Ф. Ф. Амиров // Экспериментальная хирургия и анестезиология. – 1956. – № 2. – С. 47.
- 2.Барановский, Д. С. Интерлейкин IL-1 β стимулирует ревитализацию хрящевого матрикса назальными хондроцитами человека *in vitro* / Д. С. Барановский, А. В. Люндуп, М. В. Балясин [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – № 21 (4). – С. 88–95. – DOI 10.15825/1995-1191-2019-4-88-95.
- 3.Барановский, Д. С. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций / Д. С. Барановский, А. Г. Демченко, Р. В. Оганесян [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – № 72 (4).
- 4.Билич, Г. Л. Анатомия человека : атлас : в 3 томах. Том 2. Внутренние органы / Г. Л. Билич, В. А. Крыжановский. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 824 с.
- 5.Бисенков, Н. П. О топографии бронхиальных артерий / Н. П. Бисенков // Хирургия, 1953. – № 2 – С. 17–24.
- 6.Губарева, Е. А. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс / Е. А. Губарева, А. С. Сотниченко, И. В. Гилевич // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. VII, № 4. – С. 38–45
- 7.Губарева, Е. А. Способ оценки качества децеллюляризованных матриксов для получения биоинженерных трансплантатов : патент на изобретение RUS 2619642 28.06.2016 / Е. А. Губарева, Е. В. Куевда, А. А. Басов [и др.].
- 8.Давыдов М. И. Два случая аллотрансплантации трахеи / М. И. Давыдов // Повторная публикация материала 475 заседания московского онкологического общества (от 22.02.2001) с дополнениями // Вестник московского онкологического общества. – 2002, октябрь. – С. 3.
- 9.Дыдыкин, С. С. Анатомио-экспериментальное обоснование аллотрансплантации трахеи на сосудистой ножке / С. С. Дыдыкин. – М. : КДУ, 2006. – 112 с.

10.Клабуков, И. Д. Многослойная тканеинженерная конструкция на основе биodeградируемых и биосовместимых материалов для восстановления поврежденных желчных путей : дис. ... канд. биол. наук : 14.03.03 / Клабуков Илья Дмитриевич. – М., 2018. – 205 с.

11.Кованов, В. В. Оперативная хирургия и топографическая анатомия / В. В. Кованов. – М., 1985.

12.Кувда, Е. В. Сравнительная характеристика методов оценки цитотоксических свойств биологических каркасов / Е. В., Кувда Е. А. Губарева, А. С. Сотниченко [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. № 1. – С. 57–61.

13.Лазаренко, Ф. М. Закономерности роста и превращения тканей и органов в условиях культивирования (имплантации) их в организме / Ф. М. Лазаренко. – М. : МЕДГИЗ, 1959. – 400 с.

14.Левашев, Ю. Н. Первый клинический опыт аллотрансплантации трахеи и изолированного легкого / Ю. Н. Левашев, П. К. Яблонский, С. М. Черный [и др.] // Трансплантология и искусственные органы. – 1998. – № 4. – С. 12.

15.Левашев, Ю. Н. Успешная одномоментная трансплантация грудного отдела трахеи у больной с идиопатическим фиброзирующим медиастинитом и резким стенозом трахеи / Ю. Н. Левашев, П. К. Яблонский, С. М. Черный [и др.] // Пульмонология. – 1991. – № 1 (2). – С. 14–19.

16.Лопухин, Ю. М. Экспериментальная хирургия / Ю. М. Лопухин. – М. : Медицина, 1971. – 346 с.

17.Мосин, И. В. Комплексное лечение протяженных рубцовых стенозов верхней трети трахеи / И. В. Мосин, А. Б. Сангинов, А. А. Бажанов // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2011. – № 2. – С. 37–39.

18.Паршин, В. Д. Хирургия трахеи с атласом оперативной хирургии / В. Д. Паршин, В. А. Порханов. – М. : Альди-Принт, 2010. – 477 с.

19.Перельман, М. И. Хирургия трахеи / М. И. Перельман. – М. : Медицина, 1972.

20.Привес, М. Г. Анатомия человека / М. Г. Привес, Н. К. Лысенков, В. И. Бушкович. – М., 2004.

21.Сергиенко, В. И. Топографическая анатомия и оперативная хирургия : в 2 томах. Т. 1 / В. И. Сергиенко, Э. А. Петросян, И. В. Фраучи ; под ред. Ю. М. Лопухина. – М. : Геотар-Медиа, 2001.

22.Середин, Р. В. Роль и место бронхоскопических оперативных вмешательств в комплексном лечении больных с рубцовыми стенозами трахеи : дис канд. мед. наук : 14.00.27 / Середин Роман Викторович. – М., 2003. – 150 с.

23.Ступина, Т. Суставной хрящ: изменения при чрескостном дистракционном остеосинтезе, физиологическая и репаративная регенерация (обзор литературы) / Т. Ступина [и др.] // Гений ортопедии. – 2012. – № 4.

24.Татур, А. А. Междисциплинарный подход к классификации приобретенных рубцовых стенозов трахеи / А. А. Татур, С. И. Леонович, М. К. Недзведзь // Здоровоохр. – 2008. – № 7. – С. 44–48.

25.Черный, С. С. Реконструктивная хирургия протяженных и мультифокальных рубцовых стенозов трахеи : дис канд. мед. наук : 14.00.27 / Черный Сергей Семенович. – М., 2011. – 99 с.

26.Abott, O. A. Experience with the surgical resection of the human carina, tracheal wall and contralateral bronchial wall in cases of right total pneumonectomy / O. A. Abbott / J. Thorac. Surg. – 1950. – N 19. – P. 906–922.

27.Amin Tavassoli, M. M. M. Mesenchymal stem cells can survive on the extracellular matrix-derived decellularized bovine articular cartilage scaffold / M. M. M. Amin Tavassoli [et al.] // Iranian journal of basic medical sciences. – 2015. – V. 18, N 12. – P. 1221.

28.Netter, F. H. Atlas of Human Anatomy / Frank H. Netter. – Elseiver, 2008.

29.Azorin, J. F. Tracheal replacement with an aortic autograft / J. F. Azorin, F. Bertin, E. Martinod, M. Laskar // European journal of cardio-thoracic surgery. – 2006. – N 29 (2). – P. 261–263.

30.Bader, A. Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach / A Bader, P Macchiarini // J. Cell Mol. Med. – 2010 Jul. – N 14 (7). – P. 1877–1889.

31. Badylak, S. F. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds / S. F. Badylak, D. Taylor, K. Uygun // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2011. – V. 13. – P. 27–53.
32. Baiguera, S. Dynamic decellularization and cross-linking of rat tracheal matrix / S. Baiguera, C. Del Gaudio, E Kuevda [et al.] // *Biomaterials*. – 2014. – N 35 (24). – P. 6344–6350. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2014.04.070.
33. Baiguera, S. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation / S. Baiguera, P. Jungebluth, A. Burns [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – N 31 (34). – P. 8931–8938. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2010.08.005.23.
34. Berg, M. Replacement of a Tracheal Stenosis with a Tissue-Engineered Human Trachea Using Autologous Stem Cells: A Case Report / M. Berg, H. Ejnell, A. Kovács [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2014. – N 20 (1-2). – P. 389–397.
35. Berg, M. Replacement of a Tracheal Stenosis with a Tissue-Engineered Human Trachea Using Autologous Stem Cells: A Case Report / M. Berg, H. Ejnell, A. Kovács [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2012.
36. Bottema, J. R. Incorporation of microporous teflon tracheal prosthesis in rabbits: evaluation of surgical aspects / J. R. Bottema, C. H. Wildevuur // *J. Surg. Res.* – 1986. – N 41. – P. 16–23.
37. Carbognani, P. Experimental tracheal transplantation using a cryopreserved aortic allograft / P. Carbognani, L. Spaggiari, P. Solli, [et al.] // *Eur. Surg. Res.* – 1999. – N 31. – P. 210–215.
38. Chang, C. H. [et al.] Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells / C. H. Chang [et al.] // *Journal of biomedical materials research Part A*. – 2014. – V. 102, N 7. – P. 2248–2257.
39. Cheng, N. C. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix / N. C. Cheng, B. T. Estes, H. A. Awad, F. Guilak // *Tissue Engineering Part A*. – 2009. – N 15 (2). – P. 231–241.

40. Clagett, O. T. Resection of the trachea: an experimental study and a report of a case / O. T. Clagett, J. H. Grindlay, H. J. Moersch // Archives of Surgery. – 1948. – N 57 (2). – P. 253–266.
41. Cotton, B. H. Resection of the trachea for carcinoma; report of two cases / B. H. Cotton, B. Hills, J. R. Penido // The Journal of thoracic surgery. – 1952. – N 24 (3). – P. 231.
42. Craig, R. L. Tracheal resection and replacement with a prosthesis / R. L. Craig, G. W. Holmes, E. J. Shabart // The Journal of thoracic surgery. – 1953. – N 25 (4). – P. 384–396.
43. Cull, D. L. Tracheal reconstruction with polytetrafluoroethylene graft in dogs / D. L. Cull, K. P. Lally, E. A. Mair [et al.] // Ann. Thorac. Surg. – 1990. – N 50. – P. 889–901.
44. Deslauriers, J. Innominate artery rupture: a major complication of tracheal surgery / J. Deslauriers, R. J. Ginsberg, J. M. Nelems, F. G. Pearson // The Annals of thoracic surgery – 1975. – N 20 (6). – P. 671–677.
45. Ellis Jr., P. R. The use of heavy Marlex mesh for tracheal reconstruction following resection for malignancy / P. R. Ellis Jr., O. B. Harrington, A. C. Beall Jr., M. E. De Bakey // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 1962. – N 44 (4). – C. 520–527.
46. Gerek, M. Laryngotracheal reconstruction update / M. Gerek // Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2001. – N 9. – P. 209–213,
47. Gilpin, A. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications / A. Gilpin, Y. Yang // Biomed. Res. Int. – 2017. – N 2017. – P. 9831534. – DOI 10.1155/2017/9831534.
48. Go, T. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs / T. Go, P. Jungebluth, S. Baiguero, A. Asnaghi [et al.] // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2010. – N 139 (2). – P. 437–443. – DOI 10.1016/j.jtcvs.2009.10.002.

49. Gonfiotti, A. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results / A. Gonfiotti, M. O. Jaus, D. Barale [et al.] // *Lancet*. – 2014 Jan 18. – N 383 (9913). – P. 238–244. – DOI 10.1016/S0140-6736(13)62033-4.
50. Greenberg, S. D. Tracheal reconstruction: an experimental study / S. D. Greenberg // *Archives of Otolaryngology*. – 1960. – N 72 (5). – P. 565–574.
51. Grillo H., 2002, *The Annals of thoracic surgery*, 73(6), 1995–2004; Neville et al //, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 99. – P. 604–612, 1990
52. Hajizadeh, M. S A case report Running head: Tissue-engineered trachea / S. Hajizadeh, M. Olausson, S. Sumitran-Holgersson.
53. Hamilton, N. J. Tissue-engineered tracheal replacement in a child: A 4-year follow-up study / N. J. Hamilton, M. Kanani, D. J. Roebuck [et al.] // *American Journal of Transplantation*. – 2015. – N 15 (10). – P. 2750–2757.
54. Heurn L.W. [et al.]1996; Minuto A. et al., 1998; Yokota H. et al., 1999; Walz M.K. et al., 1999.
55. Hunziker, E. B. An educational review of cartilage repair: precepts & practice-myths & misconceptions-progress & prospects / E. B. Hunziker, K. Lippuner, M. J. B. Keel [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2015. – N 23. – P. 334–350.
56. Iop, L. The Rapidly Evolving Concept of Whole Heart Engineering / L. Iop, E. Dal Sasso, R. Menabò [et al.]. // *Stem. Cells Int.* – 2017. – N 2017. – P. 8920940. – DOI 10.1155/2017/8920940.
57. Jorissen, M. Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract / M. Jorissen, B. van der Schueren, H. van den Berghe, J. J. Casserman // *Eur. Respir. J.* – 1991. – N 2. – P. 210–217.
58. Jorissen, M. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro / M. Jorissen, B. van der Schueren, H. van den Berghe, J. J. Casserman // *Arch Otorhinolaryngol.* – 1989. – N 246. – P. 308–314.
59. Jung, S. Y. 3D printed polyurethane prosthesis for partial tracheal reconstruction: a pilot animal study / S. Y. Jung, S. J. Lee, H. Y. Kim [et al.] // *Biofabrication*. – 2016. – N 8 (4). – P. 045015.

60.Jungebluth, P. The concept of in vivo airway tissue engineering / P. Jungebluth, A. Bader, S. Baiguera [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – N 33 (17). – P. 4319–4326. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.03.016.

61.Jungebluth, P. Tissue-engineered airway: a regenerative solution / P. Jungebluth, G. Moll, S. Baiguera, P. Macchiarini // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2012. – N 91 (1). – P. 81–93.

62.Jungebluth, P. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study / P. Jungebluth, E. Alici, S. Baiguera [et al.] // *The Lancet*. – 2011. – Vol. 378, iss. 9808. – P. 1997–2004. – DOI 10.1016/S0140-6736(11)61715-7.

63.Keshishian, J. M. Tracheal reconstruction / J. M. Keshishian, E. J. Beattie Jr., B. Blades // *The Journal of thoracic surgery*. – 1956. – N 32 (6). – P. 707.

64.Kheir, E. Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering / E. Kheir, T. Stapleton, D. Shaw [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res*. – 2011. – N 99A. – P. 283–294.

65.Kiyotake, E. A. Cartilage extracellular matrix as a biomaterial for cartilage regeneration / E. A. Kiyotake, E. C. Beck, M. S. Detamore // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2016 Nov. – N 1383 (1). – P. 139–159. – DOI 10.1111/nyas.13278.

66.Kojima, K. Tissue engineering in the trachea / K. Kojima, C. A. Vacanti // *The Anatomical Record*. – 2014. – N 297 (1). – P. 44–50.

67.Kucera, K. A. Tracheal replacements: part 1 / K. A. Kucera, A. E. Doss, S. S. Dunn [et al.] // *ASAIO J.* – 2007. – N 53. – P. 497–505.

68.Lehmann, J. Recellularization of auricular cartilage via elastase-generated channels / J. Lehmann, S. Nürnberger, R. Narcisi [et al.] // *Biofabrication*. – 2019. – N 11 (3). – P. 035012.

69.Lim, M. L. Decellularized feeders: an optimized method for culturing pluripotent cells / M. L. Lim, P. Jungebluth, S. Sjöqvist [et al.] // *Stem. Cells Transl. Med.* – 2013 Dec. – N 2 (12). – Epub 2013 Oct 28.

- 70.Marshak, G. Reconstruction of the canine trachea with urinary bladder wall / G. Marshak, J. Porter, A. J. McAdams // *The Laryngoscope*. – 1973. – N 83 (7). – P. 1090–1095.
- 71.Martinod, E. Long-term evaluation of the replacement of the trachea with an autologous aortic graft / E. Martinod, A. Seguin, K. Pfeuty [et al.] // *The Annals of thoracic surgery*. – 2003. – N 75 (5). – P. 1572–1578.
- 72.Miura, T. The contribution of the inferior thyroid artery to the blood supply of the human trachea / T. Miura, H. C. Grillo // *Surgery, gynecology & obstetrics*. – 1966. – N 123 (1). – P. 99–102.
- 73.Morotti, A. Rare bone marrow biopsy complication: a challenging case of sacroiliitis and *Staphylococcus aureus* sepsis / A. Morotti, M. C. Barozzino, A. Guerrasio // *Clinics and practice*. – 2016. – N 6 (1).
- 74.Neville, W. E. Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis / W. E. Neville, J. P. Bolanowski, G. G. Kotia // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1990. – N 99. – P. 604–612 (discussion 612–613).
- 75.Neville, W. E. Replacement of the intrathoracic trachea and both stem bronchi with a molded Silastic prosthesis / W. E. Neville, F. Hamouda, J. Andersen, F. M. Dwan // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 1972. – N 63 (4). – P. 569–576.
- 76.Nishiguchi, M. K. DNA isolation procedures / M. K. Nishiguchi, P. Doukakis, M. Egan [et al.] // DeSalle, R. *Techniques in molecular systematics and evolution* / R. DeSalle, G. Giribet, W. Wheeler, editors. – Basel : Birkhäuser, 2002. – P. 249–287. – DOI 10.1007/978-3-0348-8125-8_12.
- 77.Novochadov, V. V. Different phenotype of chondrocytes in articular cartilage: mapping, possible mechanisms, and impact to implant healing / V. V. Novochadov [et al.] // *European Journal of Molecular Biotechnology*. – 2014. – N 4. – P. 210–222.
- 78.Ohara, K. Chest wall deformities and thoracic scoliosis after costal cartilage graft harvesting / K. Ohara, K. Nakamura, E. Ohta.// *Plast. Reconstr. Surg.* – 1997. – N 99. – P. 1030–1036.

79.Oseni, A. O. Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering / A. O. Oseni, P. E. Butler, A. M. Seifalian // *Journal of surgical research*. – 2013. – V. 181, N. 1. – C. 41–48.

80.Papla, B. Post-intubation tracheal stenosis-morphological-clinical investigations / B. Papla, G. Dyduch, W. Frasik, H. Olechnowicz // *Pol. J. Pathol.* – 2003. – N 54 (4). – P. 261–266.

81.Parmaksiz, M. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine / M. Parmaksiz, A. Dogan, S. Odabas // *Biomed. Mater.* – 2016. – N 11. – P. 022003.

82.Parshin, V. D. Long-term outcomes of tracheal transplantation: success and unsolved problems / V. D. Parshin, A. V. Lyundup, E. A. Tarabrin, V. V. Parshin // *Khirurgiia*. – 2018. – N 11. – P. 11–19.

83.Pearson, F. G. Tracheal stenosis complicating tracheostomy with cuffed tubes: clinical experience and observations from a prospective study / F. G. Pearson, M. Goldberg, A. J. Da Silva // *Archives of Surgery*. – 1968. – N 97 (3). – P. 380–394.

84.Sabás, A. A. Replacement of the trachea with dura mater: Experimental work / A. A. Sabás, J. B. Uez, O. Rojas [et al.] // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 1977. – N 74 (5). – P. 761–765.

85.Salassa, J. R. Gross and microscopical blood supply of the trachea / J. R. Salassa, B. W. Pearson, W. S. Payne // *The Annals of thoracic surgery*. – 1977. – N 24 (2). – P. 100–107.

86.Salmeron, J. Tracheal transplantation: superior and inferior thyroid artery perfusion territory / J. Salmeron, , P. J. Gannon, K. E., Blackwell [et al.] // *The Laryngoscope*. – 1998. – N 108 (6). – P. 849–853.

87.Sesterhenn, A. M. Treatment of benign tracheal stenosis utilizing self-expanding nitinol stents / A. M. Sesterhenn, H. J., Wagner, H., Alfke [et al.] // *Cardiovascular and interventional radiology*. – 2004. – N 27 (4). – P. 355–360.

88.Sutherland, A. J. The bioactivity of cartilage extracellular matrix in articular cartilage regeneration / A. J. Sutherland [et al.] // *Advanced healthcare materials*. – 2015. – V. 4, N 1. – P. 29–39.

89.Sutherland, A. J. Decellularized cartilage may be a chondroinductive material for osteochondral tissue engineering / A. J. Sutherland, E. C. Beck, S. C. Dennis [et al.] // PLoS One. – 2015. – N 10. – P. e0121966.

90.Tavassoli, A. Mesenchymal stem cells can survive on the extracellular matrixderived decellularized bovine articular cartilage scaffold / A. Tavassoli, M. M. Matin, M. A. Niaki [et al.] // Iran J. Basic Med. Sci. – 2015. – N 18. – P. 1221–1227.

91.Trump, B. F. Methods of organ culture for human bronchus / B. F. Trump, J. Resau, L. A. Barrett // Methods in Cell Biology / C. C. Harris, B. F. Trump, G. D. Stoner (eds.). – New York : Academic Press. 1980. – P. 1–14.

92.Waterman, D. H. Discussion of Keshishian / D. H. Waterman // J. Thorac. Surg. – 1956. – N 32(6). – P. 725

93.Xu, Y. Tissue-engineered trachea regeneration using decellularized trachea matrix treated with laser micropore technique / Y. Xu, , D. Li, Z. Yin [et al.] // Acta biomaterialia. – 2017. – N 58. – P. 113–121.

94.Yanagihara, K., Mizuno, H., Wada, H., & Hitomi, S. (1997). Tracheal stenosis treated with self-expanding nitinol stent / , K. Yanagihara, , H. Mizuno, , H. Wada, & S. Hitomi (1997). // The Annals of thoracic surgery. – 1997. – N 63 (6). – P. 1786–1789.

95.Yang Q. et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells / Q. Yang [et al.] // Biomaterials. – 2008. – V. 29, N 15. – P. 2378–2387

96.Yesmin S., Paget M. B., Murray H. E., Downing R. Bio-scaffolds in organ-regeneration: Clinical potential and current challenges / S. Yesmin, M. B. Paget, H. E. Murray, R. Downing // Curr. Res. Transl. Med. – 2017 Sep. – N 65 (3). – P. 103–113. – DOI 10.1016/j.retram.2017.08.002.

97.Zhang, L., Liu, Z., Cui, P., [et al.] (2007). SIS with tissue-cultured allogenic cartilages patch tracheoplasty in a rabbit model for tracheal defect / , L. Zhang, , Z. Liu, , P., Cui [et al.] (2007). // Acta oto-laryngologica. – 2007. – N 127 (6). – P. 631–636.

98.Ziegelaar, B. W., Aigner, J., Staudenmaier, R[et al.] (2002). The characterisation of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement / , B. W. Ziegelaar, , J. Aigner, , R. Staudenmaier [et al.] (2002). // Biomaterials. – 2002. – N 23 (6). – P. 1425–1438.

99.Ziegelaara, B. W. The characterisation of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement / Brian W. Ziegelaara [et al.] // Biomaterials. – 2002 Mar. – N 23 (6). – P. 1425–1438. – DOI 10.1016/s0142-9612(01)00264-2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Подготовка научно-исследовательской работы была бы невозможна без поддержки профессора Института хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля Андреа Барbero и профессора Ивана Мартина.

Отдельная благодарность выражается моим научным руководителям к. м. н. Алексею Валерьевичу Люндупу и профессору д. м. н. Владимиру Дмитриевичу Паршину. Также хотелось бы поблагодарить коллектив сотрудников Отдела передовых клеточных технологий Сеченовского Университета. Прежде всего, заведующего отделом Илью Дмитриевича Клабукова, ведущего научного сотрудника Михаила Евгеньевича Крашенинникова, моих коллег – Максима Витальевича Балясина, Ольгу Андреевну Красильникову, Анну Гасымовну Демченко, Алексея Леонидовича Файзуллина, Льва Константиновича Абдуллаева.