На правах рукописи

Барановский Денис Станиславович

Создание тканеинженерных конструкций для восстановления критических дефектов трахеи

14.01.17 – Хирургия
14.03.03 – Патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН **Паршин Владимир Дмитриевич**

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук **Люндуп Алексей Валерьевич**

Официальные оппоненты:
Пищик Вадим Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра госпитальной хирургии медицинского факультета, профессор кафедры, Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городской клинический онкологический диспансер», заместитель главного врача по хирургии
Темнов Андрей Александрович, доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», лаборатория специальных клеточных технологий, заместитель заведующего лабораторией
Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского» (ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского)

Защита состоится «20» сентября 2021 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.03 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), по адресу: 119991 г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), по адресу: 119034 г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37, стр. 1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор **Семиков Василий Иванович**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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. При этом 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, 2002 // The Annals of thoracic surgery. 1995–2004. N 73 (6); Neville et al. // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1990. N 99. P. 604–612). Последние данные свидетельствуют о том, что пациенты с протяженным рубцовым стенозом остаются сложной группой среди хирургических заболеваний трахеи. Их частота значительно возросла в последние годы, в т. ч. 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. // Pol. J. Pathol., 2003). Хирургическое лечение протяженных стенозов и дефектов трахеи, составляющих более 50% длины трахеи у взрослых или 30% у детей, сопряжено с повышенным риском послеоперационной несостоятельности и других тяжелых осложнений (Berg M., et al. // Tissue Engineering Part A. 2012; Мосин И. В. и др. // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. 2011. № 2. С. 37–39). 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 // Upton. 1994; Cull D. et al. // Ann. Thorac. Surg. 1990). Однако, несмотря на широкое распространение научных работ 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 et al. // American Journal of Transplantation. 2015. N 15 (10). P. 2750–2757). Создание новой технологии получения тканеинженерной конструкции трахеи и отдельных ее компонентов является ключевым вопросом в разработке пригодного трансплантата.

Степень разработанности темы исследования

Ревитализация матриксов-носителей, обеспечивающая длительное полноценное функционирование тканеинженерных конструкций трахеи, является одной из актуальных задач, стоящих перед современной реконструктивной торакальной хирургией. На сегодняшний день выполнен ряд работ по созданию тканеинженерных конструкций путем модификации кадаверных хрящевых тканей различными способами, такими как детергент-энзиматическое воздействие, лазерное излучение и др. (Chang C., 2014; Tavassoli M., 2015; Yang Q., 2008; Nishiguchi M., 2002; Xu Y., 2017). Однако использованные ранее подходы и методы создания матриксов-носителей не позволяли обеспечить полноценную ревитализацию хрящевой ткани трахеи человека и создать физиологически совместимую конструкцию на ее основе, способную поддерживать просвет трахеи при ортотопической имплантации.

Цель исследования – создать тканеинженерные конструкции для закрытия критических дефектов трахеи в эксперименте с применением методов девитализации и лазерного травления естественных тканей трахеи и ревитализации матриксов различными типами клеток.

Задачи исследования

1. Выполнить обзор литературы.

2. Создать биодеградируемую 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.

3. Выполнить имплантации ТИТ лабораторным животным в ортотопическую позицию и оценить биосовместимость и эффективность ТИТ при реконструкции критических дефектов стенки трахеи животных в эксперименте по следующим критериям:

– отсутствие тотальной резорбции тканеинженерной конструкции в отдаленном послеоперационном периоде после имплантации;

– отсутствие отторжения тканеинженерной конструкции в отдаленном послеоперационном периоде после имплантации;

– отсутствие рубцового стеноза трахеи у реципиентов;

– регенерация слизистой оболочки в просвете трахеи.

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

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

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

7. Выполнить имплантации ТИК лабораторным животным в ортотопическую позицию и изучить физиологическую совместимость и эффективность данной ТИК по следующим критериям:

– отсутствие тотальной резорбции хряща дыхательных путей в послеоперационном периоде после имплантации;

– отсутствие отторжения хряща дыхательных путей в послеоперационном периоде после имплантации;

– отсутствие рубцового стеноза у реципиентов трахеи;

– регенерация слизистой оболочки в просвете трахеи.

Научная новизна

Проведена оценка возможности 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 КЛЭ. Имплантация ТИТ кролика лабораторному животному (кролик породы «Серый великан») при моделировании критического дефекта стенки трахеи не показала признаков отторжения трансплантата, развития рубцового стеноза просвета, трахеомаляции, выраженного воспаления тканей, или миграции ТИТ.

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

Эффективность и безопасность ТИК 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.

Новизна и приоритеты проведенных исследований защищены двумя патентами РФ: «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).

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны 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 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 трахеомаляции. Предложенные в настоящей работе подходы к созданию матриксов-носителей для получения хрящевой ткани трахеи человека могут быть использованы при разработке ТИК и различных имплантируемых протезов дыхательных путей.

Метод лазерного травления может использоваться для изготовления матриксов носителей для тканевой инженерии 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.

Материалы и методы исследования

Методом клеточной адгезии КЛЭ и МСК КМ на поверхности матрикса-носителя получены трехслойные конструкции – ТИТ трахеи кролика.

Методом лазерного травления хрящевой ткани трахеи изготовлены матриксы-носители для ТИК трахеи человека. Проведены гистологические исследования и сканирующая электронная микроскопия поверхности. Для оценки ревитализации матрикса-носителя проведены культуральные работы *in vitro*, выполнены имплантации образцов готовых конструкций в эксперименте

in vivo. Проведены прижизненные промежуточные исследования состояния конструкции с помощью компьютерной томографии. Выполнены морфологические исследования эксплантированных образцов методами гистологии и иммунофлюоресценции. Работа с лабораторными животными выполнялась в Центральном виварии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России и в Институте хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля (г. Базель, Швейцария).

Основные 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 исследования использованы в учебно-методическом процессе на кафедре хирургии № 1 и отдела передовых клеточных технологий института Регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

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, 1 таблицу и список литературы из 99 источников, в том числе 25 на русском языке и 74 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологические материалы, использованные для изготовления матриксов-носителей ТИК. В качестве материала для получения бесклеточного матрикса-носителя применяли образцы нативной трахеи кроликов-доноров породы «Серый великан». Для получения матриксов-носителей хрящевой ткани трахеи человека использовали части хрящевых колец трахеи кадаверного донора.

Девитализация и модификация структуры биологических материалов. Для модификации образцов нативной ткани использовали метод замораживания – оттаивания с циклическим охлаждением тканей в жидком азоте и нагреванием в водяной бане при +37 °С.

Модификация структуры девитализированных тканей трахеи человека для обеспечения клеточной миграции при ревитализации осуществлялась методом лазерного травления, посредством кратковременного (импульсного) воздействия лазерного излучения CO2-лазера. В результате процедуры лазерного травления лунками покрывали до 90±10% поверхности матрикса.

Оценка цитотоксичности матриксов-носителей. Оценку цитотоксичности всех матриксов-носителей перед ревитализацией клеточным ресурсом проводили экстракционным методом на культуре МСК КМ кролика и стандартизованных клеточных линий с помощью МТТ-теста.

Клеточные культуры. Ревитализацию матриксов-носителей на основе девитализированной трахеи кролика проводили с помощью последовательного заселения всей поверхности матриксов МСК КМ. При этом внутренняя поверхность матриксов дополнительно заселялась и эпителиальными клетками.

Ревитализацию матриксов-носителей, представляющих собой девитализированную хрящевую ткань трахеи человека, подвергнутую лазерному травлению, проводили с помощью одномоментного заселения всей поверхности матриксов назальными хондроцитами. Ревитализация выполнялась в полнокомпонентной питательной среде в статической культуре на полупроницаемой мембране (trans-well culture) в 24-луночном планшете со вставками для культивирования на полупроницаемой мембране (ThermoFisher, США) из расчета 0,25 млн клеток на 1 мм^2 поверхности матрикса-носителя. Получение первичных культур клеток человека было выполнено на базе Института хирургических исследований Университеткого госпиталя Базеля (г. Базель, Швейцария).

Лабораторные животные. В рамках разработки экспериментальных хирургических методов моделирования критического дефекта трахеи выполнялись предварительные исследования на 20 крысах линии Вистар возрастом от 3 до 6 месяцев и массой тела от 200 до 400 г. Экспериментальные работы по имплантации матриксов носителей и тканеинженерных конструкций хрящевой ткани трахеи человека в эктопическую позицию выполнены на двух линейных безтимусных мышах “nude mice”.

Экспериментальные работы по имплантации матриксов носителей и тканеинженерных конструкций в ортотопическую позицию выполнены на 11 кроликах породы «Серый Великан» исходной массой тела 3,5–4,5 кг в возрасте 0,5–1 год.

Все экспериментальные работы выполнены 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.

Оценка состояния ТИТ и ТИК в ортотопической позиции in vivo. Для визуализации и оценки состояния трахеи в области ортотопической имплантации ТИТ или ТИК, а также оценки имплантата in vivo, кроликам выполняли Мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) через 3 месяца (для ТИТ) или 4 недели (для ТИК хрящевой ткани трахеи) после имплантации для животных с имплантированной тканеинженерной

конструкцией трахеи кролика или хрящевой ткани человека соответственно. 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).

Морфологические исследования. Морфологические исследования проводили методами электронной, световой, флуоресцентной и конфокальной микроскопии с окраской образцов гематоксилином-эозином, окраской по Маллори, иммунофлюоресцентным окрашиванием “live-dead” и антителами против CDH, CKPan, Ki67.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Создание ТИТ кролика и оценка приживления ТИТ после имплантации в ортотопическую позицию. Путем витализации матрикса-носителя создана ТИТ кролика, заселенная МСК КМ на внешней поверхности и КЛЭ кролика на внутренней поверхности матрикса-носителя (Рисунок 1).

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 трехмерную цифровую модель дыхательных путей кролика (Рисунок 2).

Было отмечено небольшое сужение в области имплантации не более ⅓ просвета трахеи. 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 увеличения частоты дыхательных движений или падения сатурации.

Морфологическое гистологическое исследование не выявило в зонах имплантации ТИТ признаков гнойного воспаления или асептического некроза вокруг материала. Это свидетельствует об отсутствии развития осложнений у животного в ходе эксперимента, связанных с тканевой реакцией на имплантат и развитием инфекционных заболеваний дыхательных путей.

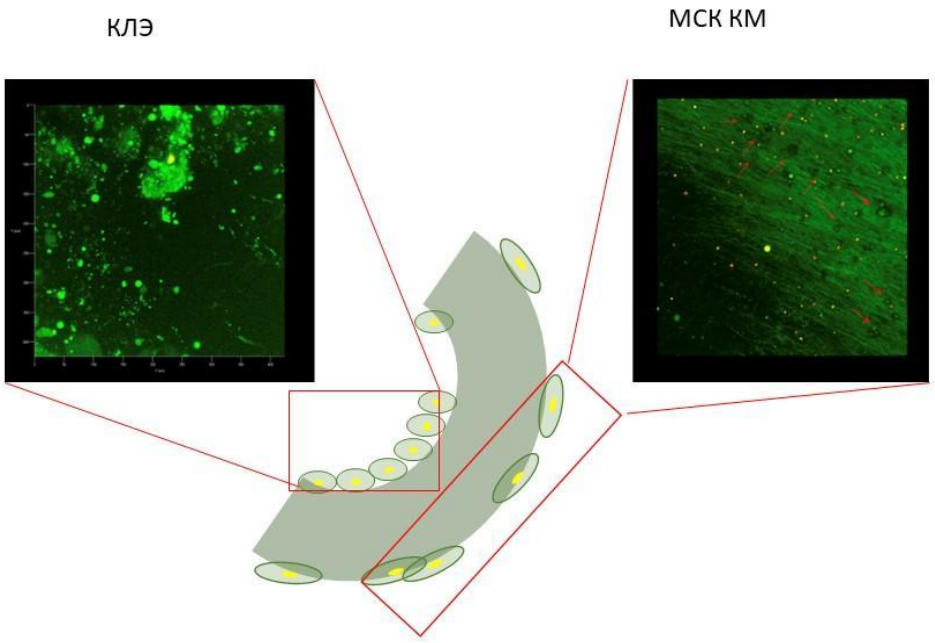


Рисунок 1 – Схематичное изображение клеточной адгезии на матриксе-носителе при создании ТИТ кролика: КЛЭ – живые клетки легочного эпителия кролика на внутренней поверхности ТИТ окрашены зеленым, конфокальная микроскопия, окраска “life-dead”; МСК КМ – живые мезенхимальные стромальные клетки костного мозга кролика на внешней поверхности ТИТ отмечены красными стрелками, конфокальная микроскопия, окраска “life-dead”

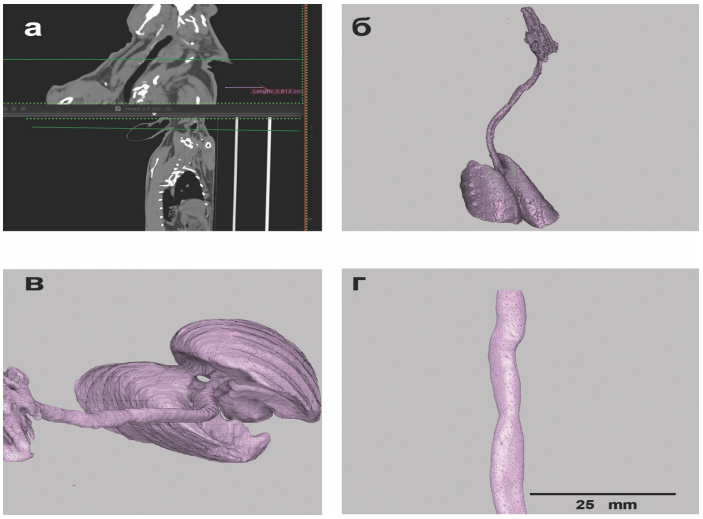


Рисунок 2 – Модель дыхательных путей кролика: (**а**) МСКТ снимок области имплантации ТИТ; (**б, в**) общий вид модели дыхательных путей; (**г**) модель просвета трахеи в области имплантации

На Рисунке 3 приведены результаты иммунофлюоресцентного окрашивания на CKPan (Рисунок 3, а, б, в), белки межклеточных

взаимодействий — кадгерины (CDH) (Рисунок 3г), маркер клеточной пролиферации Ki-67 (Рисунок 3, а, б).

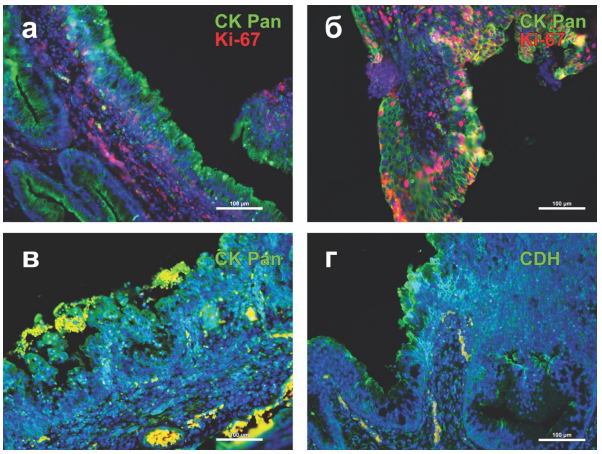


Рисунок 3 – Стенка кроличьей трахеи в зоне имплантации. Иммунофлюоресцентная окраска клеточных ядер Hoechst 33342 (голубая флуоресценция). Масштабный отрезок 100 мкм. Увеличение ×200

Оценка бесклеточных матриксов-носителей на основе кадаверных хрящевых тканей человека, подвергнутых лазерному травлению. Исследование образцов методом сканирующей электронной микроскопии позволило визуализировать полусферическую структуру лунок диаметром 100±50 мкм и площадь покрытия перфорациями 90±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 4).

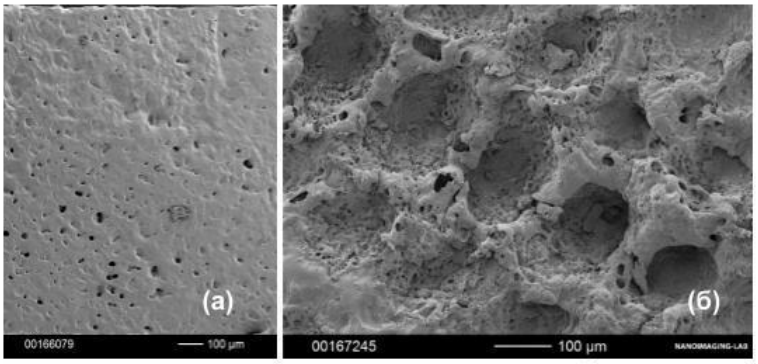


Рисунок 4 – Сканирующая электронная микроскопия с напылением золота:
(**а**) поверхность девитализированной хрящевой ткани трахеи человека;
(**б**) поверхность матрикса-носителя, полученного в результате лазерного травления девитализированного кадаверного хряща трахеи человека

Оценка цитотоксичности матриксов-носителей на основе кадаверной хрящевой ткани не выявила признаков цитотоксичности. Выживаемость клеток

во всех наблюдениях составила более 95%. Значения количественных измерений эндотоксина во всех образцах среды оказались в пределах допустимой нормы.

Исследование образцов ТИК хрящевой ткани трахеи человека. Гистологическое исследование готовой ТИК обнаружило высокую степень колонизации лунок. При исследовании образцов контрольной группы, не подвергавшихся лазерному травлению, была обнаружена лишь поверхностная колонизация матрикса-носителя (Рисунок 5).

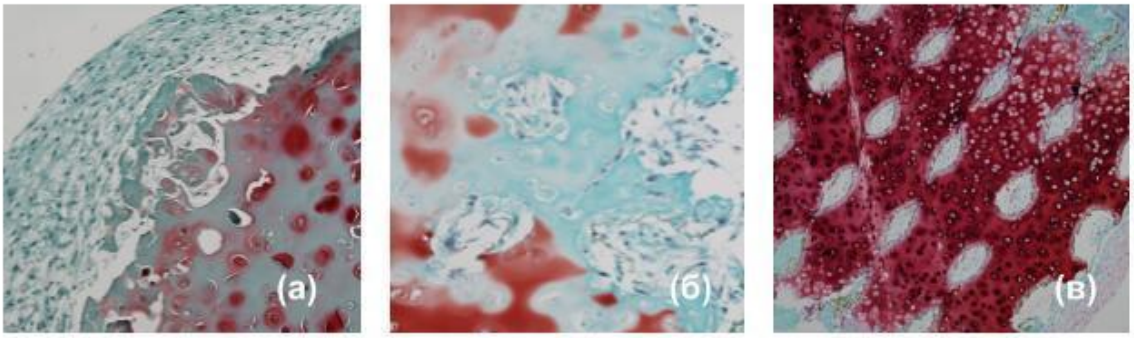


Рисунок 5 – Гистологическое исследование поперечных срезов ТИК хрящевой ткани трахеи (перпендикулярно плоскости перфорации), световая микроскопия, окраска: Сафранин-О и гематоксилин: (**а**) образец хрящевой ткани трахеи, не подвергнутый лазерному травлению (контрольная группа) увеличение × 200; (**б**) назальные хондроциты в лунках ТИК хрящевой ткани трахеи человека, увеличение ×200; (**в**) ТИК хрящевой ткани трахеи человека, общий вид, увеличение ×100

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.

Исследование качества ревитализации и биосовместимости ТИК хрящевой ткани трахеи человека после имплантации in vivo в гетеротопическую позицию. Гистологическое исследование образцов тканеинженерной конструкции спустя 8 недель после имплантации в гетеротопическую позицию (подкожно) бестимусные гипоиммунным мышам позволило визуализировать более интенсивную колонизацию лунок клеточным

компонентом. Поры ТИК оказались полностью заполнены новообразованной хрящеподобной тканью, в отдельных лунках, образованных лазерным травлением, отмечалось 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. Окраска ДНК методом биотинилированной положительной контрольной олиго-пробы (ALU) позволила идентифицировать ядра клеток в толще эксплантированной конструкции как человеческие.

Исследование эффективности ТИК хрящевой ткани трахеи человека при имплантации in vivo в ортотопическую позицию с закрытием дефекта стенки трахеи. МСКТ шеи и органов грудной клетки, выполненное двум кроликам 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 6 видно, что просвет трахеи кролика после имплантации ТИК (Рисунок 6а) остается неизменным на всем протяжении до бифуркации. У кролика, перенесшего имплантацию неревитализированного матрикса-носителя (Рисунок 6б), отмечается незначительный стеноз просвета трахеи в области дистального анастомоза, не превышающий одной трети диаметра трахеи выше и ниже стенозированного участка.

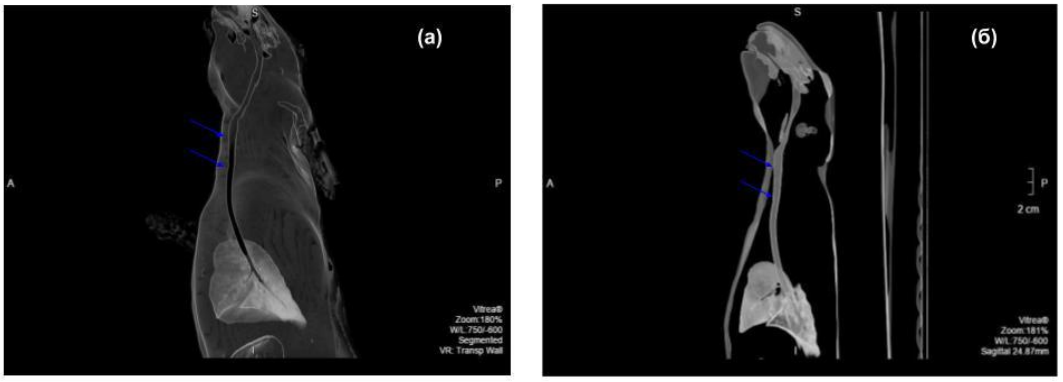


Рисунок 6 – МСКТ головы, шеи и грудной клетки кролика через 4 недели после операции, синими стрелками обозначено положение имплантата:
(**а**) состояние после имплантации ТИК; (**б**) состояние после имплантации матрикса-носителя

Последующее гистологическое исследование образцов четырех эксплантированных тканеинженерной конструкции (опытная группа) и четырех

матриксов-носителей (контрольная группа) 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 на Рисунке 7.

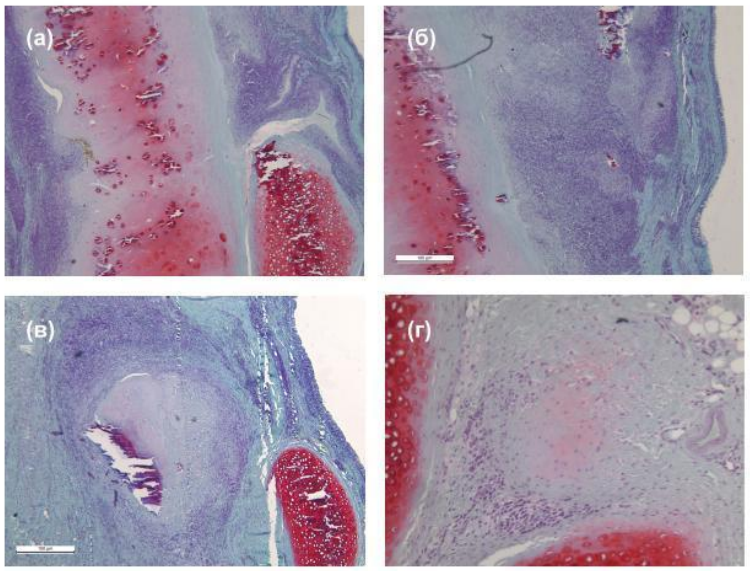


Рисунок 7 – ТИК хрящевой ткани трахеи и ее матрикса-носителя через 8 недель после ортотопической имплантации, окраска Сафранин-О и Гематоксилин, световая микроскопия: (**а**) общий вид матрикса-носителя в ортотопической позиции, продольные (в сагиттальной плоскости) срезы экспланта (**б**) слизистая 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально-хирургический метод резекции переднебоковой 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.

При решении задачи создания оптимальной ТИК трахеи, 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 биодеградации 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.

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.

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 трахеомаляции, 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*.

Практические рекомендации

Разработанные в настоящей работе способы получения биологически и физиологически совместимой ТИТ, а также ТИК хрящевой ткани трахеи могут быть использованы для разработки и создания наиболее совершенных многослойных тканеинженерных конструкций трахеи и бронхов с оценкой их эффективности на крупной животной модели в ходе доклинических исследований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендуемых ВАК:

1. ***Барановский Д.С.,*** *Люндуп А.В., Балясин М.В., Клабуков И.Д., Красильникова О.А., Крашенинников М.Е., Паршин В.Д.* Интерлейкин il-ie стимулирует ревитализацию хрящевого матрикса назальными хондроцитами человека in vitro // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. Т. 21, № 4. С. 88–95.

2. *Балясин М.В.,* ***Барановский Д.С****., Демченко А.Г., Файзуллин А.Л., Красильникова О.А., Клабуков И.Д., Крашенинников М.Е., Люндуп А.В., Паршин В.Д.* Экспериментальная ортотопическая имплантация тканеинженерной конструкции трахеи, созданной на основе заселенного мезенхимальными и эпителиальными клетками девитализированного матрикса // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. Т. 21, № 4. С. 96–107.

3. *Балясин М.В.,* ***Барановский Д.С****., Клабуков И.Д., Демченко А.Г., Файзуллин А.Л., Красильникова О.А., Крашенинников М.Е., Люндуп А.В., Паршин В.Д.* Ортотопическая имплантация тканеинженерной конструкции на основе девитализованного матрикса для восстановления поврежденной трахеи: in vivo исследование // Гены и Клетки. 2019. Т. 14, № S. С. 34–35.

4. ***Барановский Д.С.,*** *Демченко А.Г., Оганесян Р.В., Лебедев Г.В., Берсенева Д.А., Балясин М.В., Паршин В.Д., Люндуп А.В.* Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций // Вестник Российской академии медицинских наук. 2017. Т. 72, № 4. С. 254–260.