

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кубанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Гилевич Ирина Валериевна

**ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО
КАРКАСА И НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КОСТНОМЗГОВЫХ
МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ**

14.01.17 – хирургия

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель –
доктор медицинских наук
профессор, академик РАН
В.А.Порханов
доктор медицинских наук
профессор, академик РАН
В.П.Чехонин

Краснодар – 2017

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ (Обзор литературы).....	16
1.1 Современные способы лечения стенозов трахеи.....	16
1.2 Тканевая инженерия как новый подход к лечению заболеваний	24
1.3 Основные типы клеток, используемые в тканевой инженерии трахеи	33
1.4 Способы воздействия на функциональную активность клеток для усиления регенеративных процессов	39
1.5 Резюме	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1 Экспериментальное исследование на животных	45
2.1.1 Получение тканеинженерной конструкции трахеи	45
2.1.2 Модель гетеротопической имплантации тканеинженерной конструкции трахеи.....	46
2.1.3 Модель ортотопической имплантации тканеинженерной конструкции трахеи	46
2.2 Про-ретроспективный анализ историй болезни пациентов со стенозами трахеи.....	48
2.2.1 Ретроспективный анализ различных вариантов хирургического лечения пациентов со стенозами трахеи	48
2.2.2 Характеристика пациентов, включенных в протокол клинического исследования «Трансплантация тканеинженерной трахеи»	48
2.3 Протокол оперативного вмешательства	49
2.4 Выделение моноклеарных клеток из костного мозга	50
2.5 Получение тканеинженерной конструкции на основе синтетического каркаса и недифференцированных моноклеарных клеток костного мозга.....	50
2.6 Исследования в до- и послеоперационных периодах.....	52
2.7 Исследование жизнеспособности клеток	53
2.8 Дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток.....	54

2.9 Морфологический анализ.....	55
2.10 Цитоморфологический анализ	56
2.11 Исследование мобилизации стволовых клеток	56
2.11.1 Выделение моноклеарных клеток из периферической крови.....	56
2.11.2 Введение препаратов для стимуляции стволовых клеток	57
2.11.3 Иммунофенотипирование моноклеарных клеток.....	57
2.11.4 Определение уровня цитокинов в периферической крови.....	59
2.11.5 Общеклинические лабораторные исследования	60
2.12 Статистический анализ	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
БИОЛОГИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ ТИК ТРАХЕИ <i>IN VIVO</i> НА	
ЛАБОАТОРНЫХ ПРИМАТАХ.....	62
3.1 Характеристика животных.....	62
3.2 Биологическая совместимость ТИК с мезенхимальными стволовыми	
клетками	63
3.3 Результаты хирургического эксперимента <i>in vivo</i>	64
3.4 Резюме	67
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	
ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ПОДХОДА В ЛЕЧЕНИИ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ.....	
4.1 Анализ результатов различных вариантов хирургического лечения	
пациентов со стенозами трахеи и разработка критериев их отбора для	
включения в протокол клинического исследования	68
4.2 Биологическая совместимость тканеинженерного синтетического каркаса с	
аутологичными моноклеарными клетками.....	72
4.2.1 Количественный и качественный анализ моноклеарных клеток,	
выделенных из костного мозга	72
4.2.2 Жизнеспособность клеток, засеянных на синтетический каркас трахеи ...	73
4.3 Морфофункциональная характеристика тканеинженерной конструкции	
трахеи	75

4.3.1 Гистологическое строение и иммуногистохимическое описание тканеинженерной конструкции трахеи	75
4.3.2 Цитоморфологические изменения клеток на синтетическом каркасе <i>in vivo</i>	77
4.4 Мобилизация стволовых клеток и биологически активные вещества	78
4.4.1 Изучение мобилизации стволовых клеток под действием стимулирующей терапии.....	78
4.4.2 Исследование динамики цитокинов, молекул адгезии и факторов роста у пациентов в послеоперационном периоде.....	84
4.5 Резюме	88
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	108
ВЫВОДЫ	108
ЛИТЕРАТУРА.....	110

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

TNF- α – фактор некроза опухоли- α

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

ICAM-1 - молекула межклеточной адгезии 1 типа

VCAM-1 – молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа

IL-1 – интерлейкин-1

IL-2 – интерлейкин-2

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ИФА – иммуноферментный анализ

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

МНК – моноклеарные клетки

МТТ – 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтерразол

ПЭТ – полиэтилентерефталат

СРБ – С-реактивный белок

ТИК – тканеинженерная конструкция

ТИКСинКарНМККМ - тканеинженерная конструкция трахеи на основе синтетического каркаса, засеянного недифференцированными костномозговыми моноклеарными клетками

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В настоящее время проблемы хирургического лечения патологии трахеи сохраняют свою актуальность, что обусловлено возрастанием постинтубационных или посттрахеостомических стенозов, частота которых достигает 80% среди всей патологии трахеи (Татур А.А. и др., 2011; Murgu S. et al., 2016; Auchincloss H.G., Wright C.D., 2016). По данным ряда авторов длительная искусственная вентиляция легких приводит к развитию рубцового стеноза трахеи от 0,1 до 25% случаев (Чарышкин А.Л. и др., 2012; Топольницкий Е.Б. и др., 2012; Кичигина О.С. и др., 2015).

Несмотря на наличие целого ряда эндоскопических методов коррекции стеноза, радикальным способом излечения от этой патологии остается циркулярная резекция. Однако, при протяженных стенозах (более 50% длины трахеи) и мультифокальных поражениях выполнить безопасно циркулярную резекцию становится невозможно.

Выбор тактики лечения протяженных рубцовых стенозов трахеи представляет одну из сложных проблем торакальной хирургии (Котив Б.Н. и др., 2012). Существующие подходы к лечению с помощью замены пораженного участка стентами, ауто – или аллогraftами имеют ряд недостатков, среди которых отмечают медленную реваскуляризацию, несостоятельность анастомозов, отсутствие эпителизации, некроз ткани, прогрессирование стеноза и обструкции (Delaere P.R., 2012). Трансплантация трупной трахеи имеет ограничения, связанные с дефицитом трупного органа определенного размера, трудностью подбора иммунологически совместимого органа, пожизненной иммуносупрессивной терапией (Paremburg B., 2009). Недостатки существующих методов, отсутствие надежного и универсального способа лечения стенозов трахеи заставляют исследователей и практикующих врачей искать другой подход к решению данной проблемы (Чарышкин А.Л. и др., 2012).

Разработка тканеинженерных конструкций (ТИК) является одним из направлений регенеративной медицины и может быть рассмотрена в качестве

альтернативного и потенциально применимого способа лечения протяженных и мультифокальных стенозов трахеи (Atala A., 2012; Кирсанова Л.А., 2014).

Способы получения ТИК трахеи на основе децеллюляризированной ткани были представлены во многих работах, начиная с 2003г. (Walles T. et al., 2004; Macchiarini P. et al., 2008; Go T. et al., 2010; Berg M. и соавт., 2014). Macchiarini P. и соавт. (2008) использовали для трансплантации пациенту со стенозом трахеи децеллюляризованную трупную трахею, засеянную культивированными хондроцитами костномозгового происхождения и клетками бронхиального эпителия. Преимуществами децеллюляризированной трупной трахеи является наличие каркаса, имеющего характеристики естественного внеклеточного матрикса, способного индуцировать неоангиогенез, обеспечивать необходимое микроокружение для приживания клеток *in vivo* (Go T. et al., 2010; Baiguera S. et al., 2012). Несмотря на это, в данном методе остается ряд проблем, обусловленных: 1) нехваткой трупных донорских органов; 2) длительностью процесса децеллюляризации ткани, что не исключает снижение биомеханических свойств матрикса, бактериальную контаминацию ткани; 3) *in vitro* культивированием клеток для последующей рецеллюляризации (Jungebluth P. et al., 2012; Baiguera S. et al., 2012).

Получение трубчатых 3D-каркасов на основе синтетического каркаса является другим направлением тканевой инженерии трахеи. Было предложено несколько способов, основанных на использовании как прямых, так и бифуркационных устройств, изготовленных из различных материалов и с помощью разных техник (Lin C.H. et al., 2010; Tsukada H. et al., 2010). В 2011 г. была проведена трансплантация тканеинженерной конструкции трахеи, состоящей из синтетического каркаса, засеянного недифференцированными моноклеарными клетками, выделенными из костного мозга (ТИКСинКарНМККМ) (Jungebluth P. et al., 2011). Синтетический каркас был лишен недостатков децеллюляризированной трахеи, имел оптимальные механические свойства и был изготовлен индивидуально для пациента. Для усиления локальной дифференцировки клеток добавляли факторы роста. Результаты

исследований, проводимых в послеоперационном периоде, показали появление эпителия на внутренней поверхности каркаса (Jungebluth P. et al., 2011).

Тем не менее, необходимы исследования, подтверждающие биосовместимость предложенной Macchiarini P. и соавт. ТИК СинКарНМККМ (Jungebluth P. et al., 2011) как с клетками пациента *in vitro*, так и с организмом в целом после имплантации *in situ*. Для определения возможности клинического использования тканеинженерной трахеи также необходимо доказать, что получаемая конструкция способствует адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток. Кроме того, важно изучить дополнительные механизмы усиления процессов регенерации и создания оптимального микроокружения для приживания каркаса.

Фармакологическая мобилизация стволовых и прогениторных клеток используется во многих направлениях медицины (гематология, кардиология, неврология и др.). Известно, что мультипотентные стволовые клетки костного мозга оказывают влияние на развитие, поддержание и восстановление поврежденных или стареющих тканей взрослого организма (Коненков В.И. и др., 2011). Для развития технологий регенеративной медицины мобилизация аутологичных стволовых клеток с помощью специфических факторов роста представляется особенно актуальной, поскольку это должно способствовать приживлению, адаптации ТИК и регенерации тканей *in vivo* (Chistiakov D.A., 2010; Jungebluth P. et al., 2012). Одним из препаратов для усиления мобилизации стволовых клеток применяется гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), который способен вызывать миграцию костномозговых мультипотентных стволовых клеток в пораженные органы (Гольдберг Е.Д. и др., 2007; Дыгай А.М. и др. 2009), что может быть использовано в регенеративной медицине. Другой фактор роста, эритропоэтин, играет роль в восстановлении гемопоэтических и негемопоэтических тканей (Arcasoy M.O., 2008; Chistiakov D.A., 2010).

Актуальность настоящего исследования определяется необходимостью поиска радикальных хирургических способов коррекции мультифокальных и протяженных стенозов трахеи, поскольку существующие методы лечения не

решают кардинально проблему. При изучении тканеинженерной конструкции трахеи необходимо исследовать взаимодействие клеток с синтетическим каркасом, оценить *in vivo* влияния каркаса и биологических активных веществ на мобилизацию, пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток. Получение этих данных имеет значение для фундаментальной науки, так как позволит расширить представление о процессе регенерации органа в целом. Для практического применения ТИКСинКарНМККМ важно понимать механизмы воздействия имплантата на развитие ткани *in situ*. Полученные данные могут быть использованы для разработки метода лечения стеноза трахеи с помощью тканеинженерного подхода.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день возможность повышения эффективности терапии патологии органов дыхательной системы все активнее связывают с разработкой ТИК (Барановский Д.С. и соавт., 2015; Киселевский М.В. и соавт., 2016). Такие конструкции максимально приближены по организации к нативной ткани и помогают организму восстанавливать его структуру в месте повреждения (Hertegard S. et al., 2016; Crowley C. et al., 2015; Sheikh F.A. et al., 2016). Для получения каркасов изучают материалы как натурального, так и синтетического происхождения (O'Brien F.J., 2011; Crowley C. et al., 2015; Wormald J.C. et al., 2015). В настоящее время критерии оценки каркасов для ТИК не стандартизированы. Но большинство исследователей в этой области считает биосовместимость каркасов с клетками одним из важных требований, определяющих дальнейшие перспективы использования ТИК (O'Brien F.J., 2011; Чехонин В.П. и соавт., 2012г; Севастьянов В.И., 2014; Yan B. et al., 2017). В нескольких работах на грызунах была показана биосовместимость матриксов из синтетического бионеразлагаемого полиэтилентерефталата для создания каркасов трахеи (Gustafsson Y. et al., 2012; Ajalloueiian F. et al., 2014). Однако, на мелких животных не всегда возможно моделирование патологических процессов, вследствие очевидных отличий в видовых, антропометрических и биологических

параметрах с таковыми у человека (Агрба В.З. и соавт., 2012), что требует проведение экспериментальных исследований на модели крупного животного.

Вышеизложенное свидетельствует о важности и целесообразности изучения проблемы лечения мультифокальных и протяженных стенозов трахеи, необходимости проведения экспериментальной работы на крупных животных, характеристики подготовленной и имплантированной ТИК.

Цель исследования

Разработать тканеинженерный подход в хирургическом лечении больных с мультифокальными и протяженными стенозами трахеи на основе конструкции из синтетического каркаса, засеянного аутологичными моноклеарными клетками костного мозга, и стимулирующей терапии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором роста и эритропоэтином.

Задачи

1. Оценить параметры биологической совместимости тканеинженерной конструкции трахеи на основе синтетического каркаса и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток приматов вида *Papio hamadryas* в эксперименте *in vivo*;
2. Изучить результаты различных вариантов хирургического лечения пациентов со стенозами трахеи и определить критерии отбора больных для включения в протокол клинического исследования «Трансплантация тканеинженерной трахеи»;
3. Определить морфофункциональные характеристики аутологичных моноклеарных клеток костного мозга, засеянных на полиэтилентерефталатный каркас, с помощью МТТ-теста и гистологических методов исследований;
4. Исследовать процессы мобилизации стволовых клеток костного мозга с помощью проточной цитометрии под действием стимулирующей терапии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором роста и эритропоэтином после имплантации тканеинженерной конструкции трахеи;

5. Провести сравнительный количественный иммуноферментный анализ провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-1, интерлейкина-2), факторов роста (эритропоэтина, фактора роста эндотелия сосудов), молекул адгезии (Е-селектина, молекул межклеточной адгезии 1 типа, молекул адгезии сосудистого эндотелия 1 типа) в сыворотке крови пациентов с имплантированной тканеинженерной конструкцией трахеи в раннем послеоперационном периоде.

Научная новизна исследования

Впервые были проведены экспериментальные работы на крупных животных – приматах вида *Papio hamadryas* по воссозданию оперативного лечения трахеи с помощью тканеинженерной конструкции.

Впервые в России в условиях *in vivo* и *in vitro* была показана перспективность терапии стенозов трахеи с помощью тканеинженерной конструкции, состоящей из синтетического каркаса и аутологичных моноклеарных клеток костного мозга. Предложенный способ получения тканеинженерной конструкции имел преимущества перед другими способами, связанные с 1) наличием индивидуально изготовленного синтетического каркаса, размеры которого полностью соответствовали размерам нативной трахеи пациента; 2) сокращением времени культивирования *in vitro* за счет заселения недифференцированными клетками, что обеспечивает только их прикрепление к каркасу и пролиферацию, а их дальнейшая дифференцировка происходит после имплантации *in situ* в самом организме.

Впервые у человека получены результаты исследований биосовместимости, морфофункциональных свойств тканеинженерной конструкции трахеи на основе синтетического каркаса и недифференцированных костномозговых моноклеарных клеток. Было определено, что клетки, засеянные на синтетический каркас, жизнеспособны, адгезируются к его поверхности, пролиферируют, а также способны к дифференцировке в тканеспецифичные клетки. Полученные результаты развивают научное представление о клиническом применении тканеинженерных конструкций в терапии стенозов трахеи.

Впервые, было показано, что на фоне стимулирующей терапии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором роста и эритропоэтином происходит мобилизация стволовых клеток и усиления регенеративных процессов при применении тканеинженерной конструкции. В отличие от проведенных ранее работ установлено, что под действием стимулирующей терапии происходит мобилизация не только гемопоэтических стволовых клеток, но и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, активируются процессы в иммунной системе, которые принято обозначать как цитокиновая реакция.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют представление о регенерации органа и ткани, о влиянии тканеинженерной конструкции трахеи на организм. Фактические данные и теоретические обобщения выполненного исследования могут быть использованы в торакальной хирургии, регенеративной медицине, трансплантологии.

Практическая значимость результатов исследования заключается в возможности решения проблемы и повышения эффективности лечения протяженных и мультифокальных стенозов трахеи.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование носит клинико-экспериментальный характер. Экспериментальное моделирование стеноза трахеи проводилось на модели приматов вида *Papio hamadryas*. Клиническая часть работы выполнена в дизайне ретроспективного анализа историй болезни пациентов со стенозами трахеи и проспективного исследования серии случаев. Были использованы экспериментальный, описательный, культуральный, морфологический, общелабораторный, иммуноферментные методы анализов и статистический методы. Избрана совокупность культуральных и морфологических методов, позволяющая охарактеризовать полученную тканеинженерную конструкцию трахеи. Были использованы методы проточной цитометрии для иммунофенотипирования

периферической крови и иммуноферментного анализа определения содержания биологически активных веществ для изучения реакции организма на стимулирующую терапию гранулоцитарным колониестимулирующим фактором роста и эритропоэтином.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Совокупность принципов, определяющих возможность использования тканеинженерной конструкции для замены органов и тканей, включает в себя подтверждение биосовместимости каркаса, отсутствие цитотоксичности и его морфофункциональную характеристику. Мезенхимальные стволовые клетки приматов и недифференцированные моноклеарные клетки костного мозга человека *in vitro* сохраняют свою жизнеспособность на синтетическом каркасе трахеи, адгезируются к его поверхности, обладают пролиферативной активностью. После имплантации на внутренней стороне тканеинженерной конструкции трахеи *in situ* происходит формирование *de novo* дыхательного эпителия.

2. Тканеинженерный подход в лечении заболеваний трахеи представляет собой использование достижений тканевой инженерии и клеточных технологий, а также подразумевает фармакологическое воздействие, направленное на улучшение процессов регенерации. Выявлена целесообразность введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста и эритропоэтина для мобилизации стволовых клеток костного мозга, в том числе и мезенхимальных стволовых клеток, которые необходимы для восстановления ткани в месте имплантации тканеинженерного органа. Происходит активация провоспалительных, противовоспалительных цитокинов, факторов роста, которые оказывают влияние на стволовые клетки и регенеративные процессы.

3. После имплантации тканеинженерной конструкции трахеи организм реципиента может выполнять роль биореактора. Дифференцировка клеток на внутренней поверхности имплантата, мобилизация стволовых клеток, изменение уровня разных биологически активных веществ свидетельствуют об активации

процессов заживления, что обеспечивает создание оптимального микроокружения для формирования ткани *in situ*.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов исследования определяется корректным формированием групп данных, использованием современных, информативных и адекватных задач методов исследования и обработкой полученных результатов современными методами статистического анализа. Сформулированные выводы и практические рекомендации аргументированы и логически вытекают из результатов исследования.

Основные положения диссертации изложены на Второй всероссийской школе по регенеративной медицине для молодых ученых с международным участием «От трансплантации к регенеративной медицине» (Краснодар, 2012), Третьей всероссийской школе для молодых ученых с международным участием «Регенеративная медицина. Мировой опыт биоинженерии сердца и легких» (Краснодар, 2012), Международном симпозиуме и Четвертой всероссийской школе по регенеративной медицине для молодых ученых с международным участием «Регенерация органов и тканей» (Краснодар, 2013), Международной научной конференции «Наука будущего» (Санкт-Петербург, 2014), Международном симпозиуме и Школе молодых ученых «Регенерация интраторакальных органов и тканей» (Краснодар, 2014), Всемирной конференции по регенеративной медицине (Германия, Лейпциг, 2015), Дальневосточная научно-практическая конференция по регенеративной медицине и клеточным технологиям – Инновации в медицине «Дальневосточная научно-практическая конференция по регенеративной медицине и клеточным технологиям» (Владивосток, 2017), III Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2017).

По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 6 в журналах, из перечня рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов кандидатских диссертаций и 2 статьи в зарубежных журналах, индексируемые в международных цитатно-аналитических базах данных Web of Science, Scopus.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты исследований используются в научно-исследовательской и педагогической работе кафедры медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, также в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины для создания интраторакальных органов, в научно-исследовательской и педагогической работе кафедры онкологии с курсом торакальной хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Материалы данной работы используются в подготовке специалистов в области хирургии, трансплантологии и искусственных органов ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ (Обзор литературы)

1.1 Современные способы лечения стенозов трахеи

Сужение просвета трахеи может развиваться вследствие рубцовых изменений ткани, тяжелого травматического повреждения, термических и химических ожогов, а также доброкачественных и злокачественных опухолей, и привести к возникновению тяжелой дыхательной недостаточности (Stoelben E. et al, 2014).

Обструкция трахеи злокачественной опухолью возникает часто, в то время как ее опухолевое поражение встречаются редко (Никитина Э.М., Соболевский В.А., 2012), но подавляющее большинство опухолей трахеи являются злокачественными (Delaere P.R., 2012).

Ведущей причиной стеноза трахеи является длительное сдавление стенки трахеи интубационной манжетой или трахеостомической трубкой, устанавливаемых по жизненным показаниям пациентам в целях проведения адекватной искусственной вентиляции легких и составляет 80% от всей патологии трахеи (Чарышкин А.Л. и др., 2012; Топольницкий Е.Б. и др., 2012; Татур А.А., 2014; Алексеев А.В. и др., 2014; Delaere P.R., 2012; Park J.H. et al, 2014; Stoelben E. et al., 2014). При длительном сдавлении развивается рубцовый стеноз трахеи (Гюсан С.А., 2010), который связан с замещением нормальной стенки трахеи грубой рубцовой тканью, суживающей просвет дыхательного пути (Гасанов А.Л. и др., 2013). Стеноз может сочетаться с утратой стенкой трахеи каркасной функции и появлением участков трахеомаликации. По данным различных авторов частота возникновения рубцового стеноза трахеи после длительной искусственной вентиляции легких варьирует от 0,1 до 25% (Брюсов П.Г., 2006; Чарышкин А.Л. и др., 2012; Топольницкий Е.Б. и др., 2012; Лазаренко Н.Н. и др., 2014; Кичигина О.С., 2015).

Для восстановления просвета дыхательных путей у пациентов со стенозами трахеи используется большое количество различных методик от установления

трахеостомы до циркулярной резекции или выполнения этапных реконструктивно-пластических операций (Grillo H.C., 2004; Татур А.А., 2014; Delaere P.R., 2012).

Ранее возможными безопасными методами лечения пациентов было пожизненное канюленосительство или многолетняя терапия посредством повторных паллиативных трахеопластических операций, которые не всегда приводили к хорошему функциональному результату (Черный С.С., 2011).

Если поврежденный участок дыхательных путей не превышает половины от общей длины трахеи взрослого (от 1 см до 5 см в длину) или одной трети общей длины трахеи у ребенка, возможно выполнение циркулярной резекции области стеноза трахеи с последующим анастомозом конец в конец (Abbasidezfouli A. et al, 2007; Топольницкий Е.Б. и др., 2012; Jungebluth P. et al., 2012; Татур А.А., 2014).

При протяженности дефекта более половины длины выполнение такой реконструктивной операции является технически сложной задачей и сопряжено с риском несостоятельности анастомоза из-за возможного отсутствия восстановления кровоснабжения (Паршин В.Д., Порханов В.А., 2010). Несостоятельность швов межтрахеального анастомоза развивается у 3,6 – 26,3% оперированных, рестенозирование вследствие чрезмерного натяжения анастомоза – у 14,2 – 46,8% больных (Grillo H.C., 2004; Татур А.А. и др., 2011; Delaere P.R. 2012).

Трудности лечения дыхательных путей обусловлены многими причинами. Во-первых, это анатомическое и морфологическое строение самого органа: трахея имеет хрящевую плотную часть, которая обеспечивает каркасность органу, и заднюю мембранозную часть, которая является подвижной. Внутренний слой трахеи представлен респираторным эпителием, который выполняет несколько функций, главной из которых является обеспечение мукоцилиарного клиренса (Delaere P.R., 2012). Во-вторых, подвижность трахеи во время дыхания, глотания и кашля мешает адекватному прорастанию чужеродного материала во время заживления. В-третьих, сообщение внутренней части дыхательных путей с внешней средой может способствовать бактериальной контаминации анастомоза между дыхательными путями и протезом и, как следствие, будет препятствовать его интеграции (Delaere P.R., 2012).

Ларинготрахеальные стенозы представляют собой стенозы верхней трети трахеи с вовлечением подскладочного пространства гортани от нижнего края перстневидного хряща до голосовых складок и относятся к наиболее сложной патологии для радикального лечения в торакальной хирургии трахеи (Кирасирова Е.А. и др., 2006; Мосин И.В. и др., 2007; Сангинов А.Б., 2011; D'Andrilli A et al., 2016).

Пациенты с мультифокальными поражениями трахеи составляют сложную категорию больных для оперативного лечения (Abbasidezfouli A. et al., 2007; Перевозникова И.А., Козак А.Р. 2010; Черный С.С., 2011). Их особенностью является стеноз на двух уровнях с наличием интактной стенки трахеи между ними, что требует выбора лечебной тактики. По данным литературы наиболее часто применяют резекционные методы лечения (Auchincloss H.G., Wright C.D., 2016).

Для восстановления просвета дыхательных путей у пациентов со стенозами трахеи предложено и используется большое количество различных методик на основе последних достижений современной медицины (Серебренникова Е.В. и др., 2011; Назыров Ф.Г. и др., 2014; Кичигина О.С., и др., 2015).

С использованием эндоскопической хирургии просвет может быть восстановлен как механическими способами (тубусы жесткого бронхоскопа, удаление грануляций специальными циркулярными ножами, биопсионными щипцами, бужированием), так и путем воздействия на рубцовую ткань различными физическими агентами (электрокоагуляция, лазерная, ультразвуковая деструкция, криодеструкция и фотодинамическое воздействие, в том числе и их различные комбинации) (Мосин И.В. и др., 2011; Яицкий Н.А. и др., 2012; Гасанов А.Л. и др., 2013). По данным литературы, эндоскопическое лечение, как самостоятельный метод, эффективно у 1/3 больных со стойкими рубцовыми стенозами трахеи (Козлов К.К. и др., 2011).

Этапно-реконструктивные операции, которые позволяют получить достаточный для дыхания просвет трахеи у 93% больных, имеют ряд недостатков: длительный период лечения, канюленосительство, риск рецидива стеноза в отдаленном периоде и ограниченные возможности при грудной локализации рубцовых стенозов трахеи (Паршин В.Д. и др., 2012; Козлов К.К. и др., 2011).

Процент послеоперационных осложнений при хирургическом лечении колеблется от 6,2% до 28%, а послеоперационная летальность достигает 10% (Сангинов А.Б. и др., 2010; Кичигина О.С. и др., 2015).

Лечение протяженных и мультифокальных дефектов требует другого подхода, с возможным использованием замены участка трахеи (Паршин В.Д. и др., 2011). В литературе описываются разные способы замены протяженных дефектов трахеи, когда невозможно провести резекцию с анастомозом конец в конец, так как длина поврежденного участка превышает допустимую, или, когда имеется мультифокальный стеноз. С этой целью могут быть использованы стенты, ауто-, алло- или ксенографты (Никитина Э.М., Соболевский В.А., 2012; Foroulis C.N., 2012).

Впервые идея стентирования дыхательных путей возникла в 1800-х годах, а технология использования стентирования при поражениях дыхательных путей появилась во второй половине 20-го века (Kucera K.A. et al., 2007). В 1952 г. для лечения пациента с доброкачественным стенозом трахеи была использована трубка из металлического сплава, а в 1960-х годах Монтгомери разработал кремниевый Т-образный протез, названную Монтгомери Т-трубка, для стентирования трахеи (Montgomery W.W., 1965; Kucera K.A. et al., 2007).

Для стентирования используют силиконовые и металлические стенты (Saito Y., Imamura H., 2005). Широкое распространение получили такие силиконовые стенты как Монтгомери Т-трубка и ее разные версии, стент Дюмона, динамический стент (Kucera K.A. et al., 2007).

Основными преимуществами использования силиконовых стентов являются возможность их удаления, инертность, регулируемость, устойчивость к врастанию опухоли и минимальному разрастанию грануляционной ткани (Saito Y., Imamura H., 2005).

Силиконовые стенты легко подстраиваются под индивидуальные анатомические особенности дыхательных путей любого пациента. Они имеют определенный фиксированный диаметр, что предотвращает неконтролируемое растяжение (Kucera K.A. et al., 2007). Ограничения в использовании силиконовых стентов включают сложность установки; тенденции к вытеснению, искажению, или

миграции стента в случае ревизии или замены; отсутствие прорастания тканью и эпителизации; необходимость жесткой бронхоскопии и общей анестезии для установки (Saito Y., Imamura H., 2005; Kucera K.A. et al., 2007). Частота смещения стентов Дюмона и эндопротезов с гладкой поверхностью практически одинакова: 30,9% и 30,1%, соответственно (Козлов К.К. и др., 2011; Попов И.Б. и др., 2016).

Успешное использование расширяемых металлических стентов при обструкции желчевыводящих путей и сосудистых стенозах привело к их использованию в лечении доброкачественных и злокачественных стенозов дыхательных путей. Металлические стенты устанавливают в просвет дыхательных путей с помощью катетера. Они могут быть двух типов: расширяемыми в просвете баллоном (например, Palmaz-стент), и саморасширяющимися (например, Wallstent, Permalume, Ultraflex) (Kucera K.A. et al., 2007). Трубчатые стенты второго типа раскрываются до заданного диаметра.

Преимущества расширяемых металлических стентов над силиконовыми включают более легкую доставку и установку через гибкий бронхоскоп и рентгеноскоп под местной анестезией, более высокий коэффициент внутреннего диаметра к внешнему, меньшую обструкцию вследствие секреции слизи, стабильность, сниженный риск миграции и способность адаптироваться к разным размерам трахеи. Эти типы стентов также используются у пациентов с интенсивной внешней компрессией или при большой площади обструкции или стеноза. Непокрытые металлические стенты теоретически могут улучшать эпителизацию и взаимодействие с окружающими трахею тканями. Покрытые стенты имеют преимущества в ограничении распространения опухоли или грануляционной ткани, их легче заменить, в то время как, непокрытый металлический стент может потенциально вызвать врастание опухоли или грануляционной ткани (Delaere P.R., 2012).

Одними из основных недостатков в использовании расширяемых металлических стентов являются сниженная гибкость и трудность замены, что особенно проблематично для пациентов с доброкачественными стенозами трахеи или при врастании опухоли или грануляционной ткани. При этом возникшая обструкция стента требует повторной хирургической обработки раны и рестентирования. Риск

развития эрозии в окружающих структурах с возможным формированием бронховаскулярных свищей представляет собой серьезную угрозу для жизни пациента, так как вероятно развитие кровотечения, что делает использование металлических саморасширяющихся стентов неблагоприятным (Fortin M. et al., 2015).

Длительное стентирование трахеи вне зависимости от вида стента может увеличивать протяженность стеноза в результате травмирования стенки трахеи. С целью ограничения сроков стентирования трахеи рекомендуется своевременно удалять стент (Kolker A.C., 2009).

Многочисленные аутологичные ткани (часть бронхов, кожные, аортальные, перикардальные графты, слизистая оболочка щеки совместно с хрящом ушной раковины, тощая кишка, большой сальник, надкостница, обернутая большим сальником, ушные и реберные хрящи) были испробованы при реконструктивных операциях на трахеи (Grillo H., 2004). Все эти способы были успешны при замене небольшого участка.

Аутологичные ткани не обладают механическими свойствами, характерными для нативной трахеи, что ограничивает их использование. При проведении реконструктивных операций с аутохрящами был отмечен высокий уровень некроза трансплантата, поскольку не было адекватной эпителизации и кровоснабжения (Delaere P.R., 2012). Для поддержания механической прочности может быть использован аутографт вместе с искусственным материалом.

Одним из подходов восстановления резецируемого участка трахеи был предложен Martinod E. и соавт. (2005). В основе их метода лежит использование аортального аутографта. Проведенные экспериментальные исследования с использованием аортальных аллогraftов на модели свиней показали наличие метапластического эпителия через 3 месяца. Аллогенный аортальный графт содержал основные компоненты трахеи, которые были относительно незрелыми, но отличался по форме и по функции от нативной трахеи (Jaillard S. et al., 2006).

Данные других исследователей, Tsukada H. и соавт. (2010), свидетельствуют о том, что аортальные аллотрансплантаты индуцируют интенсивное паратрахеальное воспаление, в то время как сам трансплантат подвергается

некрозу. Помимо этого, данный метод требует проведения временного стентирования для поддержания механической прочности стенки до восстановления ткани.

Многие работы посвящены аллогенной трупной трансплантации трахеи как способу лечения ее патологии. Были попытки проведения трансплантации аваскуляризированных аллогraftов (Delaere P.R et al., 2010). Однако, кровоснабжение трансплантатов не успевало восстановиться: 1) из-за воздействия агрессивной среды просвета дыхательных путей на аваскулярную слизистую оболочку; 2) непрерывного движения трансплантата при дыхании, кашле и глотании, что, в конечном итоге, приводило к развитию некроза graftа (Delaere P.R., 2012).

Особенность кровоснабжения трахеи, а именно, отсутствие крупного несущего сосуда, который можно было бы анастомозировать с сосудами шеи, затрудняет восстановление адекватного кровоснабжения (Delaere P.R et al., 2010). Поэтому проводились попытки реконструкции трахейного дефекта после не прямой реваскуляризации. Этот тип реваскуляризации может быть достигнут путем обертывания трахеи тканью в гетеротопическом положении, что обеспечивает развитие сосудистой сети и перфузию по сосудистой ножке (Delaere P.R et al., 2010). Примерами такого метода являются успешная реваскуляризация аллогенной трахеи после гетеротопической имплантации в сальнике, и успешные трансплантации трахейных аллогraftов и аутографтов с участием васкуляризированного участка фасции у лабораторных животных и у людей (Delaere P.R., 2012).

Впервые Rose K.G. и соавт. (1979) провели аллогенную трансплантацию трахеи. Донорская трахея была гетеротопически имплантирована в область кивательной мышцы реципиента, а через 3 недели была трансплантирована в ортотопическое положение.

Второй случай трансплантации трахеи человека с помощью трупного аллотрансплантата описали Levashov Y.N. и соавт. в 1993 г. Метод состоял из одноступенчатой аллотрансплантации грудного сегмента трупной трахеи, завернутой в большой сальник, 24-летней пациентке с идиопатическим фиброзным медиастинитом. Несмотря на иммуносупрессивную терапию циклоспорином А и

азатиоприном прогрессировал стеноз, и пациентка, в конечном счете, нуждалась в постоянном стентировании трахеи. Это еще раз подтвердило, что выполнение ортотопической аллотрансплантации трахеи не всегда приводит к необходимым результатам (Fishman J.M. et al., 2014).

В 2010 г. Delaere P.R. и коллеги разработали протокол (Delaere P.R. et al., 2010) аллотрансплантации после не прямой реваскуляризации. Первым этапом была проведена гетеротопическая трансплантация трупной трахеи в предплечье реципиента. Пациент получал иммуносупрессивную терапию. Позже после реэпителизации аллотрансплантата собственными клетками, полученными из слизистой щеки пациента, трансплантат был имплантирован в естественное анатомическое положение. Необходимость проведения нескольких операций, длительность нахождения трахеи в гетеротопическом положении, и иммуносупрессивная терапия делают этот метод непривлекательным для лечения пациентов.

Учитывая опыт ранее проведенных работ, Makris D. и соавт. (2010) использовали для замены трахеи криоконсервированные аортальные аллогraftы, стентированные бифуркационной силиконовой трубкой. Интересно отметить, что при этом не проводилась иммуносупрессивная терапия. По результатам биопсии, проведенной через 1 год после операции, было выявлено развитие эпителия дыхательных путей (Makris D. et al., 2010). Тем не менее, недостатком данного метода являлось отсутствие механической прочности аллогraftа.

Таким образом, в настоящее время разработано большое количество консервативных и оперативных методик, позволяющих корригировать стеноз трахеи, но, несмотря на существующие успехи в хирургии трахеи, высок уровень осложнений и, как следствие, качество лечения этих больных ниже желаемого.

Общими недостатками вышеперечисленных способов замены трахеи являются миграция, смещение стентов, деградация материала, хроническая бактериальная инфекция, возникновение обструкции вследствие развития грануляционной ткани, несостоятельность анастомозов, медленная реваскуляризация с развитием стенозов и обструкции, отсутствие жесткости,

эпителизации и некроз ткани. Недостатками аллогенной трансплантации является пожизненная иммуносупрессивная терапия, поиск донорской трахеи определенных размеров, что удлиняет время ожидания операции.

Большие и окружные дефекты трахеи остаются в это время нерешенной проблемой для реконструктивной хирургии. Многие виды протезирования и тканевых трансплантатов были использованы, но получены ограниченные положительные результаты. К основным осложнениям относятся зияние анастомоза, ишемия графта и стеноз из-за плохой васкуляризации протезного комплекса (Acocella F. et al., 2007).

1.2 Тканевая инженерия как новый подход к лечению заболеваний

Тканевая инженерия в настоящее время считается наиболее перспективной альтернативой вышеуказанных методов путем создания искусственных органов (Doss A.E. et al., 2007; Atala A. et al., 2008; Badylak S.F. et al., 2009; Baiguera S. et al., 2010). Тканевая инженерия является одним из направлений регенеративной медицины, и сочетает в себе принципы и методы инженерии и биологии с целью восстановления, замещения или улучшения функции ткани и органа, используя комбинации биоматериалов и клеток (Пинаев Г.П., Богданова М.С., 2008; Atala A. et al., 2008; Jungebluth P. et al., 2011; Baiguera S. et al., 2012; Барановский Д.С и др., 2015).

Регенеративная медицина – обобщенный термин для обозначения различных терапевтических и хирургических клеточных технологий, направленных на частичную или полную компенсацию функций поврежденных или утраченных органов и тканей (Ehrenreich M., Ruszczak Z., 2006; Atala A. et al., 2008; Севастьянов В.И. и др., 2011).

Новые ткани могут быть получены путем: 1) создания только матриц (каркасов), 2) только введения ауто-, алло- или ксеногенных клеток, или 3) использования клеток, засеянных на каркас. Использование изолированных клеток или клеточных продуктов в виде микросфер, гидрогелей, возможно, поможет избежать потенциальных хирургических осложнений, позволяя

манипулировать клетками до введения в организм. Однако этот подход неприменим, когда речь идет о замене целого органа (Jungebluth P. et al., 2012).

Создание сложных трехмерных конструкций, включающих культивированные клетки, белки внеклеточного матрикса и каркасы, является одним из самых перспективных методов в регенеративной медицине. Такие конструкции максимально приближены по организации к нативной ткани и помогают организму восстанавливать его собственные ткани в месте повреждения (Агапова О.И. и др., 2015; Sheikh F.A., 2015). Результатом использования тканеинженерных конструкций служит регенерация ткани, которая происходит за счет прорастания новообразованной ткани через матриксный материал (Агапова О.И. и др., 2015; Luo Y. et al., 2015; Carballo-Molina O.A., Velasco I., 2015).

Для того чтобы процесс восстановления проходил успешно, а результат соответствовал ожиданиям, имеет значение выбор материала для изготовления каркасов, а также свойства, которыми должен обладать полученный каркас. Наиболее важными свойствами каркаса являются:

1) Биосовместимость как с клеточными компонентами, так и тканями реципиента. Ни биоматериал, ни продукты его деградации не должны вызывать развитие иммунной реакции при имплантации *in vivo*. Биосовместимый каркас должен встраиваться в организм пациента, не обладать цитотоксичностью, онкогенностью и мутагенностью (Волова Т.Г. и др., 2009; Papenburg B., 2009; Kathuria N. et al., 2009). Матрикс должен индуцировать клеточный или тканевой ответ, необходимый для достижения оптимального терапевтического эффекта.

2) Способность к биodeградации. Материал каркаса должен деградировать на нетоксичные, биологически безопасные соединения. Биodeградируемые каркасы служат временной матрицей до тех пор, пока собственные клетки не начнут продуцировать собственное межклеточное вещество. В последующем такой каркас должен быть заменен на собственный внеклеточный матрикс. Для биodeградируемых матриксов наиболее важное свойство – регулируемое время биodeградации (Волова Т.Г. и др., 2009; Papenburg B., 2009; Huang N.F., Li S., 2011). Биodeградируемые материалы синтетического и

природного происхождения применяются для создания мягких тканей, включая печень. Но не всегда при разработке тканеинженерной конструкции представляется возможным использование биodeградируемого материала, как, например, для замещения костной или хрящевой тканей, где прочность материала является одним из важных критериев, позволяющих функционировать полученной конструкции. Для биоинженерии твердых тканей используются прочные, устойчивые к биodeградации материалы из синтетических полимеров, керамики, металлов и композитов.

3) Химические свойства. Каркас должен иметь определенную поверхность для адгезии, фиксации клеток, пролиферации и дифференцировки, обеспечивать миграцию клеток по поверхности и во внутрь клеточного матрикса (Волова Т.Г. и др., 2009; Papenburg B., 2009;).

4) Механическая прочность, соответствующая тканям организма по эластичности и упругости. Такая характеристика необходима для проведения хирургических действий без повреждения как самого матрикса, так и ткани пациента (Яременко А.И. и др., 2011; Jeffries E.M. et al., 2015).

5) Пористость, т.е. доля объема пор в общем объеме матрикса. Пористость определяет успех клеточной адгезии, пролиферации, васкуляризации и нормального метаболизма клеток (Healy K.E., Guldberg R.E., 2007; Gandhimathi C. et al., 2015). При этом поры должны быть взаимосвязаны между собой, что необходимо для успешного межклеточного взаимодействия, качественной и равномерной миграции клеток в объеме матрикса при регенерации (Campinez M.D. et al., 2015).

6) Доступная производственная технология, то есть каркас может быть легко изготовлен в любых масштабах, и произведен по стандартам ISO9001 / FDA (The US Food and Drug Administration) (Vats A. et al., 2003).

На основании этих свойств, а также особенностей трубчатого органа, идеальный тканеинженерный каркас должен обладать некоторыми общими характеристиками, такими как 1) способность имитировать внеклеточный матрикс (имеет значение при выборе наиболее подходящего метода получения каркаса); 2) иметь определенные механические свойства, чтобы обеспечивать адекватную

структурную поддержку просвета органа, (например, трахея имеет прочную часть – хрящевые полукольца, и эластичную часть – мембранозную); 3) интегрироваться с окружающими тканями; 4) быть биологически совместимым, нетоксичным, не требовать иммуносупрессивной терапии и индуцировать незначительную воспалительную реакцию; 5) способствовать эпителизации и васкуляризации (Baiguera S. et al., 2010).

Биоматериалы, используемые в тканевой инженерии для изготовления каркасов, можно условно разделить на природные материалы (например, коллаген, фибрин, альгинаты и децеллюляризированные матриксы) и синтетические полимеры, такие как полигликолевая кислота (PGA), полиэтилентерефталат (PET), поликапролактон (PCL) и другие, а также их сополимеры (Atala A. et al., 2008; Севостьянова В.В. и др., 2012;).

Выбор конкретного типа материала зависит от функционального назначения конструируемого органа, механической прочности, эластичности, биосовместимости на белковом и клеточном уровнях, деградируемости, пористости, влияющих на способность поддерживать прикрепление, рост, пролиферацию и дифференцировку клеток.

В 2003 г. впервые в мире группой хирургов во главе с Macchiarini P. была проведена трансплантация участка биоинженерной трахеи, полученной из части децеллюляризированной тощей кишки свиньи, засеянной аутологичными мышечными клетками и фибробластами пациента (Walles T. et al., 2004). Основным недостатком этой методики, ограничивающей ее применение для дефектов полной окружности трахеи, было отсутствие механической прочности.

В 2008 г. была проведена клиническая трансплантация децеллюляризированной трупной трахеи и левого главного бронха, полученных детергент-энзиматическим способом (Macchiarini P. et al., 2008; Go T. et al., 2010). Последующее наблюдение выявило развитие васкуляризации и появление нового слизистого слоя (Macchiarini P. et al., 2008). С тех пор несколько других трансплантаций были успешно выполнены у взрослых и детей, в том числе и в 2010 году в России (Паршин В.Д., Порханов В.А., 2010).

Через 5 лет после проведения трансплантации децеллюляризированной трахеи было выполнено обследование одного из пациентов. Согласно полученным результатам трахея была проходима, васкуляризирована, полностью рещеллюляризована респираторным эпителием с нормальным мукоцилиарным клиренсом (Gonfiotti A. et al., 2013).

Berg M. и соавт. (2014) представили случай трансплантации децеллюляризированной трупной трахеи модифицированным детергент-энзиматическим способом и засеянной аутологичными стволовыми клетками. В раннем послеоперационном периоде развилась грибковая инфекция пересаженного графта, успешно пролеченная противогрибковыми препаратами. Однако, на 23-й день после операции пациент скончался от инфаркта миокарда. Гистологическое исследование аутопсийного материала трансплантата трахеи выявило наличие плоского эпителия, неососуды, другие дифференцированные клетки и интактные хондроциты в хряще.

Несмотря на успехи, тканеинженерный подход с использованием децеллюляризированной ткани в качестве каркаса в основном ограничивается нехваткой трупных донорских органов, что существенно замедляет получение биологических каркасов и увеличивает время ожидания операции для пациентов, длительностью процесса децеллюляризации трахеи, который составляет около 3-5 недель, что может быть ассоциировано с контаминацией. Кроме того, децеллюляризация может вызвать серьезные структурные и поверхностные изменения ткани, влияя, таким образом, на биомеханическую целостность полученных каркасов (Baiguera S. et al., 2012). При этом всегда есть вероятность сохранения резидуального клеточного материала, так как невозможно удалить клетки и клеточный материал полностью, что потенциально несет в себе угрозу развития иммунной реакции.

Преодолеть недостатки децеллюляризированной ткани возможно путем создания различных синтетических каркасов. Основными преимуществами этого подхода являются сокращение времени процедуры изготовления каркаса и возможность преодолеть нехватку донорских органов, актуальной особенно для

педиатрических больных. Кроме того, размер каркаса и форма могут полностью соответствовать анатомическим характеристикам пациента (Gustafsson Y. et al., 2012).

Исследования синтетических полимеров в качестве материалов для получения каркасов трахеи проводились уже в 90-х годах и были направлены на создания трубчатого каркаса из биodeградируемого синтетического полимера для последующего культивирования клеток (хондроцитов) на нем (Никитина Э.М., Соболевский В.А. 2012). Полученные каркасы способствовали созданию трехмерного пространства, которое позволяло хондроцитам прикрепляться, расти, осуществлять обмен газами и веществами, а также образовывать внеклеточный матрикс.

Характеристика первой изготовленной трубки из синтетического каркаса была представлена Vacanti C.A. и соавт (1994). В основе был использован каркас из PGA, засеянный хондроцитами. Данная конструкция обнаруживала признаки гиалинового хряща, однако, в целом, результаты эксперимента были неудовлетворительными, так как кровоснабжение и эпителиальная ткань не восстановились после ортотопической трансплантации.

Kojima K. и соавт. (2003), представили данные о получении аутологичного хряща из PGA каркасов, засеянных хондроцитами, выделенными из назальной перегородки, и фибробластами.

В работах Lee C.J. и соавт. (2002) и Grimmer J.F. и соавт. (2004) были исследованы каркасы, изготовленные из сополимера полилактида и полигликолевой кислоты (PLGA). В описываемых исследованиях были отмечены отрицательные результаты: выявлены нежизнеспособные хондроциты, наблюдалась высокая смертность среди животных.

Otori K. и соавт. (2008) предложил способ получения трахейных хрящей, представляющих собой трубку из марлекса (торговое название для полипропилена и полиэтилена высокой плотности), покрытую коллагеновой губкой. Изготовленный таким образом тканеинженерный каркас был имплантирован четверым пациентам. Результаты бронхоскопии, проводимые в период послеоперационного наблюдения в течение 8-34 месяцев, показало хорошо эпителизированный просвет трубки без обструкции.

В качестве возможных каркасов для создания хрящей были исследованы различные гидрогели на основе гиалуроновой кислоты, коллагена, хитозана, альгината и Pluronic F127 (сополимер полиэтиленоксида и полипропилена). Было показано, что полученные тканеинженерные хрящи на основе этих материалов имитируют естественный хрящ (Steinhoff G., 2013). Однако, индукция воспалительных реакций (Weidenbecher M. et al., 2007), медленная скорость деградации, неконтролируемая длительная биологическая реакция и низкая пластичность препятствуют их применению в создании хрящей (Ruszymah B.H. et al., 2005; Steinhoff G., 2011).

Учитывая положительный опыт использования двухслойной коллаген-силиконовой трубки для регенерации пищевода, Yamamoto Y. и соавт. в 2003 г. разработали и имплантировали собакам искусственную трехслойную трахею (Steinhoff G., 2013). Внешний слой состоял из желатина, средний слой представлял собой коллагеновую губку, а внутренним слоем был силиконовый стент. Авторы показали, что удаление стента через 8 недель не влияло на выживаемость животных, а через 6 месяцев после этого была обнаружена новая регенерирующая ткань на месте имплантированной части трахеи.

Важность функционального эпителия, выстилающего просвет протеза трахеи, была подчеркнута Kanzaki M. и соавт. (2006), который предложил использовать прямой сосудистой дакроновый протез, дополненный полипропиленовыми волокнами спиралеобразной формы. На первом этапе дакроновый протез был имплантирован животным подкожно с целью восстановления кровоснабжения и развития соединительной ткани. Через 4 недели на внутреннюю поверхность трансплантата был нанесен слой эпителиальных клеток трахеи, и конструкция была полностью пересажена в ортотопическое положение. Результаты показали, что трахейный трансплантат был покрыт зрелым, псевдомногослойным цилиндрическим эпителием (Joo Y.H. et al., 2013).

Получение трубчатых 3D-каркасов является одним из приоритетных подходов к созданию тканеинженерной трахеи (Berg M., 2014). Такие трубчатые конструкции были протестированы в исследованиях *in vivo* при ортотопических

имплантациях, исследованы регенерация ткани и заживление после протяженной резекции сегмента. Было предложено несколько способов, основанных на использовании как прямых, так и бифуркационных устройств, изготовленных из различных материалов и с помощью разных техник (Lin C.H. et al., 2010; Tsukada H. et al., 2010). Так в 2011г. первый синтетической каркас Y формы был использован для замены всей дистальной части трахеи, включая киль и оба главных бронха (Jungebluth P. et al., 2011). Каркас был создан на основе данных компьютерной томографии пациента в комбинации двух полимеров: полиэдральный силесквиоксан и поликарбонат-полиуретан. Синтетический каркас был засеян моноклеарной фракцией, выделенной из костного мозга. Последующие наблюдения через 5 месяцев после операции выявили, что анастомозы проходимы, сам графт частично был покрыт здоровым эпителием.

В экспериментальных работах на собаках были изучены свойства синтетических матриц трахеи, полученные из сополимера тетрафторэтилена с винилиденфторидом, и засеянные мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) (Киселевский М.В. и др., 2016). По результатам гетеротопной имплантации было установлено, что разработанные матрицы трахеи сохраняли целостность, не вызывали местных и системных реакций отторжения, обеспечивали колонизацию клетками реципиента и не обладали общетоксическим эффектом.

Для формирования оптимального микроокружения для жизнедеятельности клеток при культивировании на 3D-матриксах, разработаны специальные биореакторы. Биореакторы – это собирательное понятие, которое обозначает устройства для культивирования клеток от простых трубок для проточной перфузии до сложных 3D конструкций (Martin I. et al., 2009; Plunkett N., O'Brien F.J., 2010).

Биореактор должен выполнять, по крайней мере, одну из 5 функций: 1) обеспечение пространственного распределения клеток, 2) поддержание желаемой концентрации газов и питательных веществ в среде культивирования, 3) обеспечение транспортировки веществ в ткань, 4) физическое стимулирование конструкции, 5) предоставление информации о формировании трехмерной ткани (O'Brien F.J., 2011; Gelinsky M. et al., 2015).

В биореакторе должны поддерживаться стерильные условия в течение нескольких часов или даже месяцев. Тем не менее, в настоящее время очень немногие системы биореакторов отвечают необходимым условиям и предназначены для коммерческих целей. Благодаря появлению биореакторов стало возможным изучать клеточные функции, взаимодействие клеток и развитие ткани в 3D-контролируемой модели.

Успех культивирования органа в биореакторе во многом зависит от правильно выбранного каркаса для прикрепления специфического типа клеток, так как ни один из применяемых каркасов не воспроизводит естественный внеклеточный матрикс полностью (O'Brien F.J., 2011). Каким образом тот или иной каркас будет взаимодействовать с клетками, влиять на их скорость пролиферации и миграции в конкретных условиях биореактора, необходимо отбирать экспериментально. Например, Sukierman E. с соавт. (2001) показали, что децеллюляризированный внеклеточный матрикс обеспечивает в два раза более высокую скорость пролиферации клеток, чем коллагеновые матриксы в условиях биореактора.

Контролируемые условия культивирования в биореакторе позволяют добавлять биологически активные вещества, увеличивающие жизнеспособность клеток. При использовании недифференцированных стволовых клеток возможно добавление в культуральную среду факторов роста и дифференцировки.

При культивировании полых органов современные биореакторы позволяют разделять внутрилюминальные и экстралюминальные компартменты (Macchiarini P. et al., 2008). Так, для культивирования тканеинженерной трахеи специально был разработан биореактор с вращающейся внутренней частью, к которой крепился каркас, засеянный клетками. Это обеспечивало постоянное поступление к клеткам как питательных веществ, так и газов (Macchiarini P. et al., 2008).

1.3 Основные типы клеток, используемые в тканевой инженерии трахеи

Вопрос о том, какие клетки лучше использовать при разработке ТИК, остается открытым и на сегодняшний день. Проводятся исследования как с терминально дифференцированными клетками, так и стволовыми.

Первые попытки получения ТИК трахеи проводились с использованием культивированных хондроцитов (Kojima K. et al., 2003; Yang L. et al., 2003; Никитина Э.М., Соболевский В.А., 2012). Было показано, что культивированные хондроциты в монослое, выделенные из трахеи (Yang L. et al., 2003) или носовой перегородки (Homicz M.R. et al., 2002), дедифференцируются до фибробластоподобных клеток с потерей клеточной жизнеспособности, и формируют *in vivo* фиброзную ткань, а не гиалиновые хрящи. Стимуляция хондроцитов факторами роста, такими как фактор роста фибробластов и инсулин-L, приводило к нестабильности фенотипа клеток, а засеянные на каркас хондроциты были нежизнеспособны (Lee C. J. et al., 2002).

Противоположные результаты наблюдали Kojima K. и соавт. (2003), которые не выявили дедифференцировки хондроцитов и получили ТИК трахеи, состоящую из аутологичного хряща и соединительной ткани. Walles T. и соавт. (2004) показали, что хондроциты дедифференцируются при культивировании в монослое *in vitro*, при этом остаются жизнеспособными и функциональными при культивировании в 3D-условиях. Использование первичных и культивированных хондроцитарных макроагрегатов позволило Wu W. и соавт. (2007) получить конструкцию, которая поддерживала фенотип хондроцитов и развивалась *in vivo* в гомогенную хрящевую ткань. Таким образом, условия культивирования хондроцитов имеют важное значение для получения жизненно важных и функциональных хрящевых конструкций.

Кроме того, было выявлено, что хондроциты, в зависимости от источника получения, имеют разные свойства и образуют хрящевую ткань с различными функциями. Тем самым важно оценить, какой источник клеток может быть лучшим вариантом получения идеальной тканеинженерной хрящевой конструкции для замены трахеи. Было показано, что хондроциты, полученные из ушной, трахейной

или реберной части свиней, имеют сходную жизнеспособность и метаболическую активность, но предложено использовать только реберные хондроциты для получения трахейного гиалинового хряща, так как процесс выделения этих типов клеток легче, чем других (Walles T. et al., 2004).

Во многих работах показано, что возможно получить функциональный и полноценный мерцательный эпителий *in vitro* (Kobayashi K. et al., 2010; Барановский Д.С., 2015). В норме эпителий трахеи обеспечивает физический барьер и регулирует метаболические функции дыхательных путей. Sachs L.A. и соавт. (2003) предложили для стимуляции дифференцировки эпителиальных клеток трахеи использовать эпидермальный фактор роста и ретиноевую кислоту в высоких концентрациях.

В конце прошлого столетия было высказано предположение, что фибробласты могут играть ключевую роль в дифференцировке эпителиальных тканей. Goto Y. (1999) получил *in vitro* эпителий трахеи, как с помощью совместного культивирования эпителиальных клеток и фибробластов (высевали на противоположных сторонах человеческой амниотической мембраны), так и при помощи культивирования эпителиальных клеток в кондиционированной фибробластами среде, предполагая, что *in vivo* рост и дифференцировка эпителиальных клеток коррелирует с взаимодействием (опосредованным растворимыми факторами) эпителия с соединительной тканью (Atala A. et al., 2008).

Влияние МСК на пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток было продемонстрировано в работе Visage C. Le и соавт. (2004). По данным авторов совместное культивирование эпителиальных клеток с МСК поддерживает *in vitro* рост и дифференцировку клеток эпителия дыхательных путей человека на каркасах.

Кроме того, стимулирующий эффект фибробластов на рост эпителия, его пролиферацию и дифференцировку, был подтвержден Kobayashi K. и соавт. (2006). Тем не менее, показано, что крысиные фибробласты, полученные из различных источников, имеют *in vitro* различные свойства: «десневые» фибробласты индуцируют дифференцировку морфологически нормального и функционального эпителия, в то время как фибробласты, полученные из соединительной ткани

носовой полости, а также дермальные фибробласты этим свойством не обладают (Kobayashi K. et al., 2007). Исследования показали, что присутствие фибробластов внутри тканеинженерной трахеи может сократить время, необходимое для регенерации эпителия. Имплантация крысам каркаса из коллагенового геля, засеянного трахейными эпителиальными клетками и фибробластами, способствовала развитию трансплантата, полностью покрытого с внутренней стороны столбчатым и кубовидным мерцательным эпителием (Nomoto Y. et al., 2008). В данной работе было отмечено, что такие трансплантаты ускоряют *in vivo* эпителиальную дифференцировку и пролиферацию клеток.

Совместное культивирование и использование хондроцитов и эпителиальных клеток исследуется при создании искусственной трахейной конструкции на основе синтетического, композитного, или децеллюляризованного матрикса (Chistiakov D.A., 2010).

В работе Doolin E.J. (2002) *in vitro* была получена жизнеспособная конструкция на основе сокультивирования эпителиальных клеток человека и суставных хондроцитов, которые затем были соединены вместе с помощью фибринового клея (Chistiakov D.A., 2010). Kojima и соавт. (2003), используя совместное культивирование хондроцитов и эпителиальных клеток, выделенных из слизистой носовой области, получили тканеинженерную трахею, похожую на нативную и состоящую из зрелого хряща и псевдомногослойного цилиндрического эпителия, с отчетливой границей раздела между тканеинженерным хрящом и эпителием трахеи. Pfenninger C. и соавт. (2007) предложил развитие *in vitro* новой системы культивирования: совместное культивирование хондроцитов, выделенных из носовой перегородки человека, и эпителиальных клеток дыхательных путей, засеянных на противоположных сторонах коллагеновой мембраны.

Барановский Д.С. и соавт. (2015) получили функционально-полноценный мерцательный эпителий *in vitro*, выделенный из инцизионного биоптата трахеи человека, и культивируемый в специальных условиях.

Однако, сам процесс культивирования дифференцированных клеток достаточно сложен, и приживляемость этих клеток гораздо ниже, чем стволовых

клеток (Pfenninger C. et al., 2007), что заставляет ученых рассматривать стволовые клетки в качестве основного ресурса для получения тканеинженерной ткани.

Стволовые клетки взрослого организма вызывают широкий интерес как универсальный источник получения разных типов клеток. Стволовые клетки – это уникальные клетки, обладающие способностью к быстрому размножению и к дифференцировке в тканеспецифичные клетки (Krause D.S. et al., 2001; Orlic D., 2003).

Различают 3 типа стволовых клеток по их потенциям в развитии: тотипотентные, обеспечивающие развитие целого организма из одной клетки (зигота), плюрипотентные – это клетки, способные дифференцироваться во все типы соматических клеток и в половые клетки, но теряющие способность образовывать целый организм из единственной клетки (эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные клетки); мультипотентные – способностью превращения в ограниченное число типов специализированных клеток (например, мезенхимальные стволовые клетки); унипотентные – могут дифференцироваться только в единственный тип клетки или ткани. Стволовые клетки взрослого организма в естественных условиях необходимы для периодической замены отмирающих соматических клеток или в тех случаях, когда происходит гибель клеток, например, при инфекциях, травмах, кровопотере.

Эмбриональные стволовые клетки человека способны к пролиферации в недифференцированном плюрипотентном состоянии, а также к дифференцировке в различные типы специализированных клеток (Brivanlou A.H. et al., 2003). В подтверждение своей плюрипотентности эмбриональные стволовые клетки человека могут *in vitro* формировать эмбриоидные тельца (клеточные агрегаты, состоящие из трех зародышевых листов), а также образовывать тератомы *in vivo* (Itskovitz-Eldor J. et al., 2000). В настоящее время эмбриональные стволовые клетки не могут быть использованы в клинической практике в связи с этическими и правовыми ограничениями.

Индукцированное репрограммирование заключается в дедифференцировке соматических клеток взрослого организма, например, фибробластов в плюрипотентные аутогенные клетки. Сразу после открытия индуцированных

плюрипотентных клеток и до настоящего времени ведутся исследования, направленные на повышение эффективности репрограммирования для достижения большего функционального сходства с эмбриональными стволовыми клетками (Takahashi K., Yamanaka S., 2006; Park I.H. et al., 2008; Vitale A.M. et al., 2011). Хотя репрограммирование клеток является интересным феноменом, недостаточный уровень понимания механизмов этого процесса ограничивает применение этих технологий в тканевой инженерии (Nakamura T. et al., 2011).

В настоящее время аутологичные МСК, полученные из костного мозга, представляют собой наиболее популярный тип стволовых клеток, используемый в ларинго-трахеальной тканевой инженерии (Suzuki T. et al., 2008; Chistiakov D.A., 2010). Полученные из жировой ткани мультипотентные стволовые клетки могут также рассматриваться как потенциально пригодные для регенерации трахеи. Однако, до сих пор существует лишь несколько сообщений об их использовании для устранения дефектов дыхательных путей. Suzuki T. и соавт. (2008) использовали для замены дефекта трахеи у крыс МСК, полученные из жировой ткани, и засеянные на биоинженерный каркас. Авторы наблюдали через две недели после имплантации появление дифференцированного и неоваскуляризированного эпителия дыхательных путей. Тканеинженерная трахейная конструкция, полученная на основе коллагенового каркаса и засеянная фибробластами, выделенными из десны, и МСК, полученными из жировой ткани, показала хорошую регенерацию при имплантации крысам с трахейным дефектом (Kobayashi K. et al., 2010; Chistiakov D.A., 2010). Стволовые клетки, выделенные из костного мозга овцы, засеянные на PGA каркас и обработанные трансформирующим фактором роста- $\beta 2$, показали развитие *in vivo* трахейной структуры подобно нативной трахее (Chistiakov D.A., 2010).

Использование МСК в качестве клеточной линии для создания тканеинженерной трахеи имеет преимущества по нескольким причинам: 1) аспирация костного мозга может быть сделана под местной анестезией в отсутствии рисков, связанных с общим наркозом у тяжелобольных пациентов, 2) можно получить достаточное количество каждого типа клеток мезенхимной природы из МСК, тем самым сократить количество манипуляций с пациентом (Chistiakov D.A., 2010).

Nakamura T. и соавт. (2009) показали в серии экспериментов на собаках, что применение культивированных МСК костномозгового происхождения вызывает лучшее заживление в месте протезирования трахеи, по сравнению с периферической кровью. С клинической точки зрения, использование аутологичного аспирата костного мозга пациента кажется удобным и практичным, является потенциально выгодным (Nakamura T. et al., 2011).

Аутологичные моноклеарные клетки (МНК), выделенные из костного мозга, имеют этические и правовые преимущества при использовании по сравнению с другими источниками стволовых клеток (Guo X. et al., 2012; Henrich D. et al., 2015). Более того, МНК могут быть изолированы из костного мозга путем центрифугирования в градиенте плотности непосредственно перед введением (Kurobe H. et al., 2014). МНК костного мозга содержат гемопоэтические стволовые клетки, МСК, эндотелиальные прогениторные клетки и другие клетки, которые могут продуцировать различные факторы роста и стимулировать нейрогенез и ангиогенез (Guo X. et al., 2012; Mildner M. et al., 2013; Henrich D. et al., 2015). Преимуществом использования моноклеарных клеток является отсутствие иммунологической несовместимости, так как они аутологичны.

В нескольких исследованиях продемонстрирована клиническая перспектива применения МНК, выделенных из костного мозга (Wise J.K. et al. 2013). Так, было показано позитивные эффекты МНК костного мозга в аспекте восстановления функции сердца после инфаркта миокарда при их внутрикоронарном введении (Коркин Ю.Г. и др., 2006; Марков В.А. и др., 2007).

Помимо этого, многочисленные исследования выявили, что МНК способны продуцировать широкий спектр факторов роста, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), инсулиноподобный фактор роста и тромбоцитарный фактор роста (Chistiakov D.A., 2010). Более поздние работы показывают, что с помощью МНК можно доставить в область инфаркта миокарда факторы роста и цитокины, что также может оказывать терапевтический эффект (Cao F. et al., 2009; Delewi R. et al., 2014; Campbell N.G. et al., 2016). Экспериментальные исследования применения моноклеарных клеток при травме спинного мозга выявили комплекс

нейропротективных воздействий регенеративного характера (Guo X. et al., 2012, Yang B. et al., 2016). Результаты другой работы по изучению применения моноклеарных клеток при лечении легочной эмфиземы показали, что происходит регенерация легочной ткани животных, подвергнутых повреждению и обработанных этими клетками (Longhini-dos-Santos N. et al., 2013). Клинико-экспериментальному применению МНК в создании тканеинженерной трахеи в литературе уделяется достаточное внимание (Jungebluth P. et al., 2011; Hinderer S. et al., 2012; Luffy S.A. et al., 2014; Clark E.S. et al., 2016). Полученные авторами результаты в целом подтверждают возможность прикрепления клеток к каркасам различной полимерной структуры и пролиферации в них (Jungebluth P. et al. 2011; Elliott M.J. et al., 2012; Fishman J.M. et al., 2014; Crowley C. et al., 2015; Barczak W. et al., 2016).

1.4 Способы воздействия на функциональную активность клеток для усиления регенеративных процессов

Современная регенеративная медицина ведет к новой парадигме в медицине, основанной на концепции использования аутологичных технологий, которые могли бы привести к осуществлению регенерации тканей *in vivo* (Chistiakov D.A., 2010; Garcia O. et al., 2012; Stabler C.T. et al., 2015; Peloso A. et al., 2015; Pitkin Z. et al., 2016).

Практическим развитием этой новой концепции является использование собственных возможностей человека как микро-ниши. Новый подход является многоэтапным процессом, который будет включать разработку технологий, связанных с последовательным появлением факторов, необходимых для быстрой активации эндогенных прогениторных клеток, мобилизацией стволовых клеток из их пула хранения, контроля местного высвобождения воспалительных цитокинов и развития гипоксии, клеточной дифференцировки до терминальной стадии и ремоделирования внеклеточного матрикса. Эта стратегия требует глубокого знания молекулярных механизмов, пространственно-временных сигнальных и межклеточных взаимодействий, вносящих вклад в заживление ткани, в частности, трахеи, а также тщательного и строгого контроля процесса регенерации в режиме реального времени (Welman T. et al., 2015; Pitkin Z., 2016).

При любом повреждении ткани или органа развивается цепь событий, результатом которой должна быть регенерация ткани (Воротников А.В. и др., 2012). Основными участниками регенеративного процесса являются живые клетки, которые привлекаются в очаг повреждения из прилежащей ткани или из отдаленных источников. При этом в каждой фазе ключевую роль играют разные клетки: в фазе воспаления – клетки иммунной системы, в последующих фазах – прогениторные и стволовые клетки (Воротников А.В. и др., 2012). Активные участники стадии пролиферации – МСК обладают хоминг эффектом к месту повреждения. Свойства МСК к миграции и хомингу без опухолевой стимуляции были показаны несколькими группами и на разных моделях болезней (De Coppi P. et al., 2007; Prasad V.K., Kurtzberg J., 2009; Yang W.Z. et al., 2010; Schoeberlein A. et al., 2011; Mueller. et al., 2016).

Экспрессия различных молекул, вовлеченных в процесс миграции, хоминга клеток, широко изучается. Механизм, по которому МСК направляются к тканям и мигрируют через эндотелий, еще не полностью известен. Считается, что при движении эти клетки используют хемокиновые рецепторы для миграции и роллинга по кровеносному руслу, экспрессируют адгезивные молекулы, такие как VCAM, ICAM, интегрины для прикрепления к эндотелиоцитам. Внутри ткани они движутся, расщепляя внеклеточный матрикс матриксными металлопротеиназами (Воротников А.В. и др., 2012; Холоденко И.В. и др., 2014; De Becker A., Van Riet I., 2016).

В настоящее время известно, что МСК оказывают значительное противовоспалительное и иммуномодулирующее действие почти на все клетки иммунной системы с помощью различных механизмов, в частности секреции цитокинов и хемокинов, таких как интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин 6 (IL-6), трансформирующий бета-фактор роста (TGF β), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), межклеточные молекулы адгезии (ICAM) и простагландин E2 (Pg E2) (Petrella F. et al., 2015).

В следующих фазах регенерации МСК секретирует набор ростовых факторов, VEGF, EGF (эпидермальный фактор роста), PDGF (тромбоцитарный фактор роста),

ГМ-КСФ, ФРФ, SDF-1 (Стромальный фактор роста-1) и др., способствующих репарации и тканевому моделированию (Воротников А.В. и др., 2012).

Успехи молекулярной биологии в изучении хоминга клеток были подтверждены результатами трансплантации клеток. В ряде работ было показано, что после введения МСК активно взаимодействуют с микроокружением, стимулируют заживление и регенерацию тканей за счет поддерживающей и трофической функций, основанных на взаимодействии с другими клетками, присутствующими в поврежденных тканях (Sohni A., Verfaillie C.M., 2013; Petrella F. et al., 2015).

Devine S.M. (2003) и Chapel A. (2003) провели серию экспериментов по трансплантации МСК нечеловекообразным приматам и обнаружили эти клетки в разных тканях. Процент МСК в разных тканях составил от 0,1% до 2,7% (De Becker A., Van Riet I., 2016).

Миграция МСК в место повреждения после внутривенного введения была подтверждена на модели церебральной ишемии головного мозга (Ярыгин К.Н. и др., 2015); отторжения сердечного аллотрансплантата (Холоденко И.В. и др., 2014); повреждения легочной ткани; инфаркта миокарда (De Becker A., Van Riet I., 2016).

При усилении хоминга стволовых клеток в поврежденную ткань, стимуляции их пролиферации и дифференцировки возможно повысить эффективность использования аутологичных технологий. В основном, с помощью генных технологий пытаются корректировать и манипулировать функциональной активностью клеток. Примером этого может быть индуцированная сверхэкспрессия CXCR4 стволовыми клетками жировой ткани посредством вирусной трансдукции для увеличения хоминга клеток в зону повреждения (Feisst V. et al., 2015).

Для стимуляции пролиферации местных соматических и прогениторных клеток могут быть использованы эктопическая экспрессия плюрипотентных факторов, например, Sox17, необходимого для формирования ранней энтодермы. Он способен индуцировать дифференцировку прогениторных клеток в зрелые клетки легких (Lange A.W. et al., 2009). Для дальнейшей дифференцировки стволовых и прогениторных клеток надо подавлять производство Sox2 (важного для разветвления дыхательных путей).

Обсуждается применение тканеспецифических факторов роста, таких как эпидермального фактора роста, фактора роста фибробластов и других (Gontan C. et al., 2008; Chistiakov D.A., 2010; Pitkin Z. 2016).

Другой подход основан на фармакологическом воздействии на функциональную активность клеток. Одним из препаратов для усиления мобилизации стволовых клеток является гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), способный вызывать миграцию костномозговых мультипотентных стволовых клеток в пораженные органы (Гольдберг Е.Д. и др., 2007; Дыгай А.М. и др., 2009; Коненков В.И. и др., 2011), что может быть использовано в регенеративной медицине.

Широко обсуждается применение в стимулирующей терапии эритропоэтина, играющего значительную роль в восстановлении гемопоэтических и негемопоэтических тканей (Arcasoy M.O., 2008; Elliott M.J. et al., 2012; Broxmeyer H.E., 2013). Основной эффект эритропоэтина связан со стимуляцией эритропоэза. К локальным эффектам, которые оказывает эритропоэтин в местах повреждения и развития гипоксии, относят антиапоптотическое действие, стимуляцию ангиогенеза. Помимо этого, обнаружено ингибирующее влияние эритропоэтина на действия фактору некроза опухоли- α (TNF- α) (Jungebluth P. et al., 2011).

Попытка реализации новой концепции, где немаловажная роль отводится микроокружению *in vivo* при регенерации органа или ткани, и стимуляции собственных возможностей организма, была продемонстрирована группой Macchiarini P. (Jungebluth P. et al., 2012). Полученные результаты вызывают определенный интерес для проведения дальнейших исследований по реализации идеи создания тканеинженерного органа на основе синтетического каркаса и стволовых клеток при применении стимулирующей терапии.

В настоящее время разрабатываются ТИК органов как на основе синтетического материала, так и натурального матрикса, децеллюляризированной ткани. Однако, большинство исследований посвящено изучению характеристик каркасов, а также их биосовместимости с клетками на экспериментальных моделях. При большом количестве экспериментальных работ имеются только ограниченные

сообщения об успешных клинических случаях трансплантации тканеинженерной трахеи. Скорее всего, это связано с тем, что в настоящее время не существует сформированной тканеинженерной концепции, которая могла бы обеспечить теоретический “background”, обеспечивающий адекватную структурную целостность ТИК.

Оценить пригодность конструкции к имплантации, жизнедеятельность клеток на каркасе создаваемого органа не только *in vitro*, но и *in vivo*, развитие ткани *in situ* представляется необходимым и актуальным для понимания влияния имплантированной ТИК в целом на организм.

1.5 Резюме

Анализ современной научной литературы показал, что для лечения заболеваний трахеи предлагается множество разнообразных подходов. Однако, ни один из них полностью не решает проблему, требуются неоднократные вмешательства, что в целом способствует ухудшению качества жизни пациентов. Значение разработок тканевой инженерии для лечения заболеваний трахеи представляется перспективным. С помощью тканевой инженерии возможно избежать недостатков, присущих существующим методам лечения заболеваний трахеи, и попытаться излечить пациента.

В последние годы достигнут значительный прогресс в клинической трансляции тканеинженерных органов, полученных с использованием природных или синтетических каркасов, засеянных терминально дифференцированными клетками или стволовыми клетками.

Трансплантация тканеинженерной трахеи на основе синтетического каркаса в 2011 г. стала одним из примеров реализации идей тканевой инженерии (Jungebluth P. et al., 2011). Описанный метод был основан на использовании аутологичных стволовых клеток, синтетического каркаса, факторов роста, биореактора и введении препаратов, стимулирующих стволовые клетки. В данной работе представлена концепция развития *in vivo* тканеинженерного органа, а не трансплантация полностью сформированного органа в условиях *in vitro*, то есть формирование органа происходит

в организме в ортотопическом положении (Jungebluth P. et al., 2012). Такой подход, возможно, позволит избежать длительного культивирования клеток *in vitro*, препятствуя тем самым развитию нежелательных явлений, сократить время получения трансплантата (Conese M. et al., 2013).

Для разработки методов получения тканеинженерного трансплантата требуется продолжать изучение свойств ТИК, *in vivo* процессы, происходящие после имплантации тканеинженерного органа, мобилизации стволовых клеток, которые необходимы для пролиферации и дифференцировки клеток на каркасе. Анализ результатов имплантации ТИК поможет усовершенствовать оказание лечебной помощи больным со стенозами трахеи. Изучение изменений, происходящих при этом в организме, позволит расширить представления о роли регенеративной медицины в современной медицине, углубить знания о регенерации ткани, мобилизации стволовых клеток, их пролиферации и дифференцировке.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационное исследование проводилось на кафедре онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС на базе Научно-исследовательского института - Краевая Клиническая больница №1 имени профессора С.В. Очаповского Минздрава Краснодарского края (г. Краснодар), лаборатории Международного научно-исследовательского клинико-образовательного центра регенеративной медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (г. Краснодар) и на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (г. Сочи).

2.1 Экспериментальное исследование на животных

Исследование выполнено на 6 нечеловекообразных приматах вида *Pario hamadryas* (павианы гамадрилы) в условиях ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии». Содержание лабораторных животных и все манипуляции проводили в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», с требованиями комитета по биоэтике и федеральным законом Российской Федерации о защите животных (статья 4 закона Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01 декабря 1999 г.).

Все исследования выполняли на половозрелых особях мужского пола, средним возрастом – $6,4 \pm 2,3$ года, весом – $19,5 \pm 3,1$ кг. Весь период эксперимента животные содержались в индивидуальных клетках.

2.1.1 Получение тканеинженерной конструкции трахеи

Для получения ТИК трахеи была использована модель динамичного засеивания каркаса в ротационном биореакторе. Синтетический трубчатый каркас, изготовленный из бионедegradуемого полиэтилентерефталата (ПЭТ), был засеян культурой аллогенных МСК, полученной из банка ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии». В день начала культивирования криоконсервированные виалы с клетками размораживали на

водяной бане при 37°C до появления жидкой фазы. Удаление криопротектора проводили путем медленного добавления к суспензии клеток среды RPMI (Панэко, Россия) с последующим центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Для засеивания синтетического каркаса использовали 86×10^6 МСК ($9,5 \times 10^6$ /мл).

Засеянный синтетический каркас культивировали в среде ДМЕМ (Панэко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина в условиях CO₂–инкубатора в течение 72 часов.

2.1.2 Модель гетеротопической имплантации тканеинженерной конструкции трахеи

Исследование местной реакции выполняли на модели подкожной гетеротопической имплантации образцов ТИК в межлопаточную область спины обезьяны. После проведения седации (внутримышечное введение золетила (lot 4MG-9, 02/2017, Virbac) в дозе 0,05 мл/кг и ксилазина гидроксихлорида (lot 357280, 18/04/2017, Interchemie weken “De Adellaar” B.V.”, Нидерланды) в дозе 0,5 мл/кг) был выполнен кожный разрез в области лопаток. Кожа была отделена от подлежащих тканей и тупфером был сформирован карман, в которой был помещен образец засеянного синтетического каркаса площадью 10 см². Интубация трахеи и искусственная вентиляция в данном случае не требовались.

2.1.3 Модель ортотопической имплантации тканеинженерной конструкции трахеи

Модель ортотопической имплантации ТИК трахеи была воссоздана с применением анестезиологического пособия и активной хирургической тактики. На рисунке 2.1.3.1 представлены основные этапы оперативного вмешательства. Под общим обезболиванием, после обработки операционного поля, выполнен поперечный разрез кожи 8 см на 2 см выше яремной вырезки. После мобилизации трахеи была выполнена резекция верхней ее трети протяженностью 2,5 см с оставлением 1 полукольца ниже перстневидного хряща. Налажена система высокочастотной вентиляции.

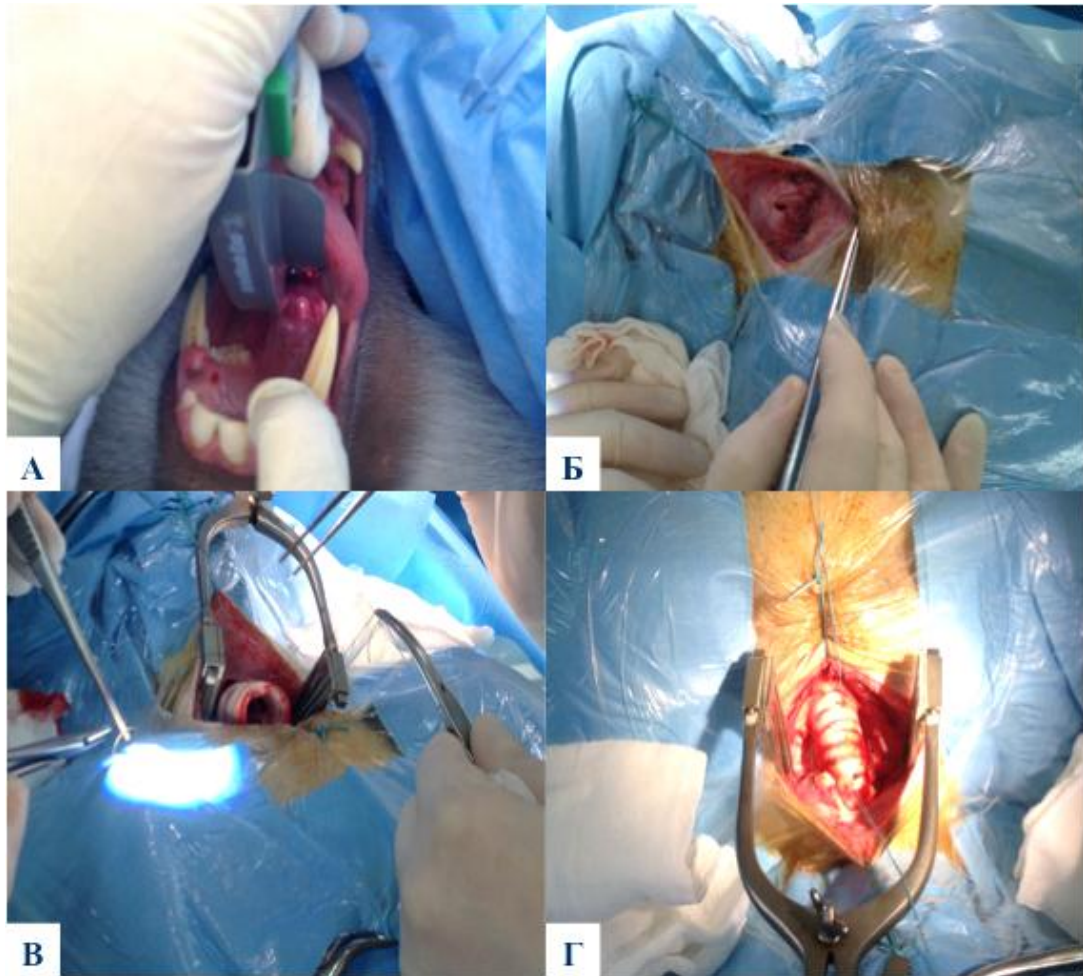


Рис. 2.1.3.1. А) Интубирование; Б) Разрез; В) Резекция нативной трахеи;
Г) Имплантация ТИК.

В рану помещена ТИК трахеи, выполнено формирование нижней полуокружности дистального анастомоза. Передняя полуокружность дистального анастомоза сформирована узловыми швами. Непрерывным обвивным швом сформирована нижняя полуокружность проксимального анастомоза, затем интубационная трубка проведена ниже дистального анастомоза, продолжена ИВЛ. Передняя полуокружность проксимального анастомоза сформирована узловыми швами. Для подтверждения герметичности проведена водяная проба. Выполнены гемостаз и послойное ушивание раны. Весь период наблюдения животных содержали в индивидуальных клетках с регулярным контролем витальных и физиологических показателей.

По завершению эксперимента, образцы ТИК, имплантированных гетеротопически, извлекались, раны глухо зашивались. Приматы возвращались в стаю по окончании послеоперационного периода. По окончании периода наблюдения животных с ортотопической операцией выводили из эксперимента путем эвтаназии в соответствии с внутренними правилами ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» с последующей аутопсией тканеинженерной конструкции.

2.2 Про-ретроспективный анализ историй болезни пациентов со стенозами трахеи

2.2.1 Ретроспективный анализ различных вариантов хирургического лечения пациентов со стенозами трахеи

Проведен ретроспективный анализ 207 медицинских карт пациентов торакального отделения ККБ №1 г. Краснодар за период с 2009 по 2014 г. Характеристика пациентов включала в себя распределение по полу и возрасту. На основании полученных данных из медицинских карт были сформированы группы в зависимости от локализации поражения дыхательного пути и способов хирургического лечения. Всего было проведено 317 оперативных вмешательств.

2.2.2 Характеристика пациентов, включенных в протокол клинического исследования «Трансплантация тканеинженерной трахеи»

С 2012 по 2014 г. было проведено 6 имплантаций тканеинженерной синтетической трахеи, засеянной аутологичными МНК, выделенными из костного мозга. В исследовании приняли участие 4 пациента, средний возраст которых составил $32,3 \pm 5,9$ лет, из них 3 мужчин и 1 женщина. Все пациенты имели диагноз: посттрахеостомический, постинтубационный рубцовый стеноз трахеи. Им была уже проведена максимальная стандартная терапия. У двух пациентов был трахеогортанный стеноз IV степени с функционирующей трахеостомой, у одного пациента был протяженный стеноз III степени с функционирующей трахеостомой, и у одного пациента – протяженный стеноз более 6 см верхней и средней трети

трахеи. В условиях стационара была выполнена циркулярная трахео-гортанная резекция участка рубцового стеноза трахеи по методу Пирсона-Матиза-Либерманна с имплантацией ТИКСинКарНМККМ трахеи. Были изучены образцы 6 тканеинженерных конструкций трахеи (20 образцов), периферическая кровь (56 образцов), костный мозг (6 образцов), смывы бронхоальвеолярного лаважа из проксимального и дистального анастомозов и средней части ТИКСинКарНМККМ (всего 36 образцов).

2.3 Протокол оперативного вмешательства

После обработки операционного поля раствором антисептика, выполнен U-образный разрез с иссечением кожно-мышечного рубца со свищевым ходом, полная продольная стернотомия. Остро мобилизованы перстневидный хрящ гортани, верхняя и средняя трети трахеи. Вскрыт перикард, взят на держалки, в аорто-кавальном промежутке мобилизована нижняя треть трахеи. Выполнена верхне-срединная лапаротомия, мобилизован лоскут большого сальника на питающей ножке. Трахея пересечена по нижнему краю перстневидного хряща с удалением пораженного участка. Выполнена резекция перстневидного хряща по методу Пирсона-Матисена-Либермана. Сформирован проксимальный анастомоз с тканеинженерным имплантатом трахеи узловыми швами. Далее сформирован дистальный анастомоз аналогичным способом. Мобилизованным лоскутом большого сальника укрыты зоны проксимального и дистального анастомозов, имплантат с разобщением от плечевого ствола. После дренирования правой плевральной полости, брюшной полости, ретростернального пространства проведен гемостаз и послойное ушивание лапаротомной и стернотомной ран.

Оперативные вмешательства на трахее и необходимые исследования выполняли на базе Краевой клинической больницы № 1 после одобрения локальным этическим комитетом (протоколы № 45, 49, 60, 62). У всех пациентов были получены информированные согласия на оказание высокотехнологичной оперативной медицинской помощи.

2.4 Выделение моноклеарных клеток из костного мозга

За 3 дня до трансплантации у пациентов (6 человек) был взят костный мозг путем билатеральной аспирации из гребней подвздошной кости в объеме 300-400 мл, МНК выделяли на градиенте Лимфолит, 1,077 г/мл (Cedarlane, Канада). После клетки трижды промывали физиологическим раствором с добавлением 5% альбумина (Octapharma, Австрия). По окончании готовую фракцию МНК ресуспендировали в питательной среде, состоящей из раствора DMEM (Gibco, США) и 10% сыворотки крови пациента. Процедура выделения полностью проходила в закрытой системе (Sepax2, Biosafe, Швейцария), что гарантировало абсолютную стерильность и полную автоматизацию. Из полученного продукта были взяты образцы для проведения бактериологического исследования, подсчета МНК и иммунофенотипирования.

Для определения необходимого количества клеток для засеивания на синтетический каркас проводили подсчет МНК с помощью витальной окраски трипановым синим. 10 мкл 0,4% раствора трипанового синего (Invitrogen, США) добавляли к 10 мкл образца МНК, стерильно забранному из пакета с готовым продуктом через специальный порт. Количество МНК считывали с помощью аппарата Countness (Invitrogen, США).

2.5 Получение тканеинженерной конструкции на основе синтетического каркаса и недифференцированных моноклеарных клеток костного мозга

Для получения тканеинженерной конструкции использовали МНК, выделенные из костного мозга, и синтетический каркас трахеи (Harvard Apparatus Regenerative Technology, США). Каркас состоял из бионедеградируемого нанокompозитного ПЭТ и представлял собой полую трубку, размеры которой полностью соответствовали размерам нативной трахеи каждого пациента, полученным в результате данных компьютерной томографии. Синтетический каркас предварительно фиксировали в биореакторе (Harvard Apparatus Regenerative Technology, США), специально разработанном для выращивания полых органов (рисунок 2.5.1).



Рис.2.5.1.Биореактор для культивирования полых органов

Готовый продукт, фракцию МНК, засеивали на каркас. С помощью системы для инфузий, подключенной к пакету с готовым продуктом, орошали каркас, вращая его вручную так, чтобы покрыть полностью всю поверхность. На рисунке 2.5.2 показан синтетический каркас трахеи до- и после фиксации в биореакторе.



А) До начала культивирования



Б) После окончания культивирования

Рис.2.5.2. А) Синтетический каркас трахеи; Б) Синтетический каркас трахеи, засеянный МНК, в питательной среде и фиксированный в биореакторе.

В биореактор добавляли питательную среду (DMEM (Gibco, США) и 10% сыворотки крови пациента), 220 мкл инсуман-базал (100 UI/ml) (Sanofi, Германия) и 4 мкл дексаметазона (100 nmol/L) (KRKA, Словения). Биореактор устанавливали на 72 часа в CO₂-инкубатор (Thermo Scientific, США), в котором поддерживались рекомендуемые параметры: температура 37°C и содержание CO₂ – 5%. В течение этого времени засеянный клетками каркас вращался в биореакторе с постоянной

скоростью. Непосредственно перед имплантацией в графт вводили эритропоэтин (40000 ЕД) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) (263 мкг), инсуман-базал (220 мкл) и дексаметазон (4 мкл). В день операции двукратно исследовали фрагменты тканеинженерной конструкции трахеи по нижеприведенному протоколу (см. таблицу 2.6.1). Первый раз образцы исследовали до имплантации трансплантата. Во время операции размеры тканеинженерной конструкции трахеи адаптировали под размеры удаленной части нативной трахеи. В результате чего остались отсеченные фрагменты тканеинженерной трахеи, которые использовали для проведения послеоперационных исследований.

2.6 Исследования в до- и послеоперационных периодах

В соответствии с поставленными задачами проводились исследования до операции и в послеоперационном периоде, представленными в таблице 2.6.1.

Таблица 2.6.1.

Лабораторные исследования, проводимые в до- и послеоперационном периодах

№	Виды исследований	Время проведения	
		До операции	После операции
1	2	3	4
1	Подсчет МНК, выделенных из костного мозга	1 раз	Не проводилось
2	ИФТ МНК, выделенных из костного мозга	1 раз	Не проводилось
3	ИФТ МНК, выделенных из периферической крови	1 раз	8 раз: в день операции, каждые 2 дня в течение 14 дней
4	МТТ-тест	1 раз	1 раз
5	Тест на дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток	1 раз	Не проводился
6	Исследование биологических веществ с помощью ИФА	1 раз	8 раз: в день операции, каждые 2 дня в течение 14 дней
7	Гистологическое исследование	1 раз	Не проводилось
8	Цитологическое исследование	1 раз	Не менее 4-х раз

Продолжение таблицы 2.6.1.

1	2	3	4
9	Общий анализ крови	1 раз	15 раз: в день операции, ежедневно в течение 14 дней
10	Биохимический анализ	1 раз	15 раз: в день операции, ежедневно в течение 14 дней
11	Прокальцитониновый тест	1 раз	15 раз: в день операции, ежедневно в течение 14 дней
12	С-реактивный белок	1 раз	15 раз: в день операции, ежедневно в течение 14 дней
13	Бактериологическое исследование смывов бронхоальвеолярного лаважа	1 раз	Не менее 4-х раз

Примечание: МНК – мононуклеарные клетки, ИФТ – иммунофенотипирование, ИФА – иммуноферментный анализ

2.7 Исследование жизнеспособности клеток

Для определения жизнеспособности клеток на синтетическом каркасе трахеи применяли колориметрический метод исследования с 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтерепаразолом (MTT)–реагентом (Trevigen's TACS® MTT Cell Proliferation Assay). MTT-тест технически прост, обладает необходимой чувствительностью, надежностью и воспроизводимостью и, что особо важно, позволяет оценить жизнеспособность клеток на 2D- и 3D-матриксах, митохондриальную активность и цитотоксичность материала (Черепович В.С. и др., 2006; Musa M. et al., 2013; Bonnier F. et al., 2015).

MTT-тест проводили по модифицированному протоколу исследования (Jungebluth P. et al., 2012). После 72 часов культивирования образцы экспериментальных ТИК (N = 6) и образцы ТИКСинКарНМККМ (N=6) отсекали от дистальной части фиксированного каркаса в биореакторе. Образцы размером 0,5 x 0,5 см² помещали в лунки культуральных 24 – луночных планшетов и добавляли питательную среду объемом 500 мкл. В каждую из лунок добавляли реагент MTT объемом 50 мкл, инкубировали 1 час при температуре 37°C, добавляли по 500 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия в 0.01 М HCl и

инкубировали в течение 1 часа. Затем среду из исследуемых образцов переносили в другой 96-луночный планшет.

В качестве негативного контроля использовали образцы каркаса без клеток и питательную среду. В качестве позитивного контроля анализировали культуру МНК, культивируемую в питательной среде (DMEM (Gibco, США) + 10% аутологичной сыворотки) в течение 72 часов. Клетки засевали в 96-луночный планшет при этом их плотность составляла 1×10^4 /мл.

Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на спектрофотометре (SpectraMax 250, Molecular Devices, США). Оптическую плотность в опытных лунках сравнивали с оптической плотностью контрольных лунок, содержащих засеянные клетки.

Процент эффективности засеивания клеток на каркас определяли по формуле (Dorati R. et al., 2014):

$$\text{Эффективность посева клеток} = \frac{\text{оптическая плотность (каркас+клетки)}}{\text{оптическая плотность (клетки)}} \times 100\%$$

2.8 Дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток

Двухцветный флуоресцентный анализ открывает возможности одновременного определения живых и мертвых клеток в культивируемом образце. Этот метод дифференциальной визуализации живых и мертвых клеток в одном образце обладает несколькими преимуществами при сравнении с другими приемами:

- 1) представляет собой экспресс-анализ прижизненной оценки клеток;
- 2) отличается безопасностью для клеток;
- 3) является высокочувствительным способом определения цитотоксичности.

Дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток на ТИКСинКарНМККМ после 72 часов культивирования проводили с использованием набора LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США). Материалом исследования служили образцы синтетического каркаса, отсеченные от дистальной части фиксированного каркаса в биореакторе, размером

0,5x0,5 см². Согласно инструкции производителя, использовали адаптированный протокол исследования:

1. 1 мкл кальцеина АМ и 2,5 мкл гомодимера этидия растворяли в 1 мл фосфатного буфера.
2. В полученный раствор помещали образцы тканеинженерной конструкции трахеи и инкубировали в течение 20 минут в темном месте при комнатной температуре.
3. Образцы отмывали фосфатным буфером в течение 30 секунд.
4. Результаты оценивались с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX51 (Япония).

2.9 Морфологический анализ

Гистологические исследования проводили: 1) образцов экспериментальных ТИК, подготовленных к имплантациям (N = 6), 2) по окончании эксперимента образцов экспериментальных ТИК, выделенных из ортотопического (N = 3) и гетеротопического (N = 3) положений, 3) образцов ТИК СинКарНМКМ, подготовленных к операции.

После фиксации в 10 % нейтральном забуференном формалине осуществляли заливку образцов в парафин по стандартной методике с получением парафиновых блоков. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм получали при помощи ротационного микротомы Leica RM2235 (Германия) и помещали на высокоадгезивные стекла с полилизинным покрытием.

Для общегистологической оценки срезы депарафинизировали и гидратировали с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином, флуорофором DAPI (Sigma-Aldrich, США) с целью визуализации клеточных ядер.

Для более точного анализа клеточного состава исследуемых образцов экспериментальных ТИК выполняли иммуногистохимическое исследование с антителами к виментину (ab 8978, Abcam, USA), маннозному рецептору макрофагов (ab 64693, Abcam, USA), анти-CD68 (ab 125212, Abcam, USA), панкератину (ab 8068, Abcam, USA).

Иммуногистохимический анализ экспрессии антигена Ki-67 образцов ТИК СинКарНМКМ проводили с целью определения пролиферативной активности засеянных на каркас МНК. Для этого применяли anti-Ki67 антитела (ab16667 Abcam, Англия). Анализ проводили согласно протоколу фирмы-изготовителя. Для детекции в качестве вторичных антител применяли козы антитела к IgG-H&L кролика (Alexa Fluor® 488, ab 150081, Abcam, Англия) в концентрации 1:500. После чего образцы докрашивали флуорофором DAPI. Изучение микропрепаратов проводили с помощью микроскопа Olympus IX 51 (Япония).

2.10 Цитоморфологический анализ

В послеоперационном периоде регулярно проводили бронхоскопию с бронхоальвеолярным лаважем. Полученные образцы смывов бронхоальвеолярного лаважа исследовали рутинным цитологическим методом и методом жидкостной цитологии. Использовали цитоцентрифугу «Cytospin-4» (1000об/5мин) для формирования монослойных осадков, что позволяло рассматривать клеточный состав в сохранном виде. Окраску образцов выполняли по Романовскому-Гимзе по стандартной методике: фиксация Май-Грюнвальда (Минимед, Россия) – 5 мин, окраска Романовский-Гимзе (Минимед, Россия) – 15 мин.

2.11 Исследование мобилизации стволовых клеток

2.11.1 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови

Выделение МНК из периферической крови выполняли для последующего иммунофенотипирования клеток. У каждого пациента забор периферической крови проводили за 3 дня до трансплантации, в день операции и через день после операции в течение 14 дней. Всего было получено 54 образца. Выделение МНК из периферической крови осуществляли центрифугированием в градиенте Лимфолита (Cedarlane, Канада) на центрифуге Eppendorf 5702 (Eppendorf, США) при скорости 800 об/мин в течение 30-40 мин, после чего отмывали 2-3 кратно в растворе фосфатно-солевого буфера (Панэко, Россия).

проводили в реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител, имеющих флуоресцентные метки.

Для окрашивания выделенных МНК применяли панель моноклональных антител к поверхностным антигенам: CD 34, CD 45, CD11b (Mac-1), CD14, CD73, CD90 (Thy1, Thy-1), CD144 (VE-Cadherin), CD 105 (Endoglin), меченых FITC (изотиоцианат флуоресцеина), PE (фикоэритрин), ECD (комплекс PE с техасским красным) или PC7 (комплекс PE с цианином-7) по протоколу фирмы-изготовителя. Результаты оценивали на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Основные характеристики антител представлены в таблице 2.11.3.1.

Таблица 2.11.3.1

Наименование реагентов для проточной цитометрии

Антитело	Конъюгат	Производитель
Моноклональные антитела к CD45	ECD	A07784, Beckman Coulter, Франция
Моноклональные антитела к CD34	ECD	IM2709U, Beckman Coulter, Франция
Моноклональные антитела к CD105 (Endoglin)	PE	A07414, Beckman Coulter, Франция
Моноклональные антитела к CD73	FITC	11-0739-42, Beckman Coulter, Франция
Моноклональные антитела к CD90 (Thy1, Thy-1)	FITC	11-0909-42, Beckman Coulter, Франция
Моноклональные антитела к CD14	PC7	A22331, Beckman Coulter, Франция
Моноклональные антитела к CD11b	PC7	A54822, Beckman Coulter, Франция

Иммунофенотипирование МНК костного мозга проводили один раз в день начала культивирования тканеинженерной трахеи. Иммунофенотипирование МНК, выделенных из периферической крови, выполняли однократно за 3 дня до оперативного вмешательства и в день трансплантации, в послеоперационном периоде 7 раз: через день на протяжении 14 дней.

2.11.4 Определение уровня цитокинов в периферической крови

Количественное определение содержания цитокинов в образцах сыворотки проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Исследовали образцы сыворотки крови, полученные от 6 пациентов за 3 дня до операций, в день операций и в послеоперационном периоде через день в течение 14 дней. Всего было проанализировано 27 образцов и выполнено 216 исследований.

Образцы сыворотки крови набирали в пробирки (15 мл), центрифугировали при 3000 об/мин, отделяли сыворотку, которую замораживали при температуре -80°C . До проведения ИФА образцы хранились при данной температуре. Для количественного определения биологических активных веществ использовали «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. В работе применяли наборы моноклональных антител против фактора некроза опухолей–альфа ($\text{TNF-}\alpha$), Е-селектина, молекул межклеточной адгезии 1 типа (ICAM-1), молекул адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM-1), сосудистого-эндотелиального фактора роста (VEGF), интерлейкина-1 (IL-1) и интерлейкина-2 (IL-2) (eBioscience, Австрия). Определение концентрации эритропоэтина производилось с помощью набора реагентов для определения эритропоэтина/EPO, L2KEPN2 (Siemens, США). Основные характеристики антител представлены в таблице 2.11.4.1.

Таблица 2.11.4.1

Наименование реагентов для ИФА

Биологические вещества	Производитель
Фактор некроза опухолей– α ($\text{TNF-}\alpha$)	BMS223/4, eBioscience, Австрия
Е-селектин	BMS205, eBioscience, Австрия
Молекула межклеточной адгезии 1 типа (sICAM-1)	BMS201, eBioscience, Австрия
Молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (sVCAM-1)	BMS232, eBioscience, Австрия
Васкуло-эндотелиальный фактор роста (VEGF-A)	BMS277/2, eBioscience, Австрия
Интерлейкин-1	BMS243/2, eBioscience, Австрия
Интерлейкин-2	BMS221, eBioscience, Австрия
Эритропоэтин	L2KEPN2, Siemens, США

Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на автоматическом спектрофотометре (SpectraMax 250, Molecular Devices, США) при длине волны 450 нм. После измерения реакции в лунках на основании калибровочной кривой рассчитывалась концентрация цитокина в определяемых образцах.

2.11.5 Общеклинические лабораторные исследования

Гематологические, биохимические показатели крови определяли колориметрическим методом на анализаторе ADVIA 1650 и ARCHITECT C8000.

Перед трансплантацией обязательно проводили контроль стерильности использованных растворов, образцов фракции МНК, исключали бактериологическую, грибковую и микоплазменную контаминацию, для чего брали посевы культивируемых сред и промывочных растворов. Для этих целей использовали культивирование возбудителей во флаконе на питательных средах. Любой рост в течение 48-72 часов означал нарушение стерильности, и процесс культивирования тканеинженерной конструкции трахеи должен быть прекращен, и трансплантация не должна проводиться. Все образцы продолжали исследовать в течение 14 дней на наличие микобактериальных и грибковых инфекций.

Для экспресс-анализа бактериального загрязнения непосредственно перед операцией проводили исследование культуральной жидкости из биореактора с помощью теста STAT окраски по Граму.

2.12 Статистический анализ

Выбор статистических данных определялся поставленными задачами, типом данных и характером распределения количественных признаков. Построение графиков и диаграмм, статистическую обработку материалов исследования осуществляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Для статистической обработки данных использовали как параметрические, так и непараметрические критерии. При сравнении более трех совокупностей с ненормальным распределением был использован критерий Краскела-Уоллиса или критерий Фридмана для несвязанных совокупностей. При сравнении нескольких

несвязанных совокупностей с нормальным распределением применялся метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значения достоверности различия выражались в виде «р», где $p < 0,05$ считалось статистически достоверным. Нахождение связи между признаками проводили с помощью корреляционного метода, коэффициента Пирсона.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ ТИК ТРАХЕИ IN VIVO НА ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИМАТАХ

3.1 Характеристика животных

Настоящее исследование включало 2 серии экспериментов: трем павианам проведены гетеротопические имплантации, а другим трем приматам – ортотопические имплантации. В периоде наблюдения за животными, составляющем 20 - 30 суток, интра- и постоперационная летальность отсутствовала. В течение 7 дней после операции была назначена антибактериальная терапия. Ни одного случая инфекции зафиксировано не было. Ежедневный мониторинг основных витальных показателей состояния животных выявил незначительное повышение температуры в первые дни после операции, что очевидно было связано с воспалительными реакциями организма в раннем послеоперационном периоде. В последующие дни наблюдения животные вели активный образ жизни. Частота дыхания, сердечный ритм и температура варьировали в пределах нормы. Антропометрические данные, такие как вес и рост, не изменялись за все время наблюдения. В таблице 3.1.1 представлены результаты клинического наблюдения за животными.

Таблица 3.1.1.

Клинические параметры животных

Параметры	Сутки наблюдения					
	0 день	3-е сутки	7-и сутки	14-е сутки	21-и сутки	30-е сутки
Температура	$38,5 \pm 0,2$	$39,3 \pm 0,3$	$39,0 \pm 0,2$	$38,8 \pm 0,3$	$38,8 \pm 0,2$	$38,5 \pm 0,2$
Частота дыхания	$33,7 \pm 3,3$	$37,8 \pm 3,5$	$39,7 \pm 1,0$	$39 \pm 0,6$	$38,2 \pm 2,6$	$44,3 \pm 3,8$
Аппетит	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
Физиологические отправления	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма

3.2 Биологическая совместимость ТИК с мезенхимальными стволовыми клетками

Для культивирования засеянного МСК синтетического каркаса было определено время нахождения в биореакторе трое суток. Данный промежуток времени был выбран исходя из способности клеток к адгезии к пластику и их адаптации к новым условиям *in vitro*. Для подтверждения правильного выбора времени культивирования, определения цитотоксичности материала на основе жизнеспособности клеток проводили МТТ-тест, который также свидетельствовал о биологической совместимости экспериментальной ТИК с МСК. Проведенное исследование образцов с помощью МТТ-теста *in vitro* показало, что клетки на каркасе жизнеспособны ($73,4 \pm 10,2\%$), метаболически активны (рисунке 3.2.1.).

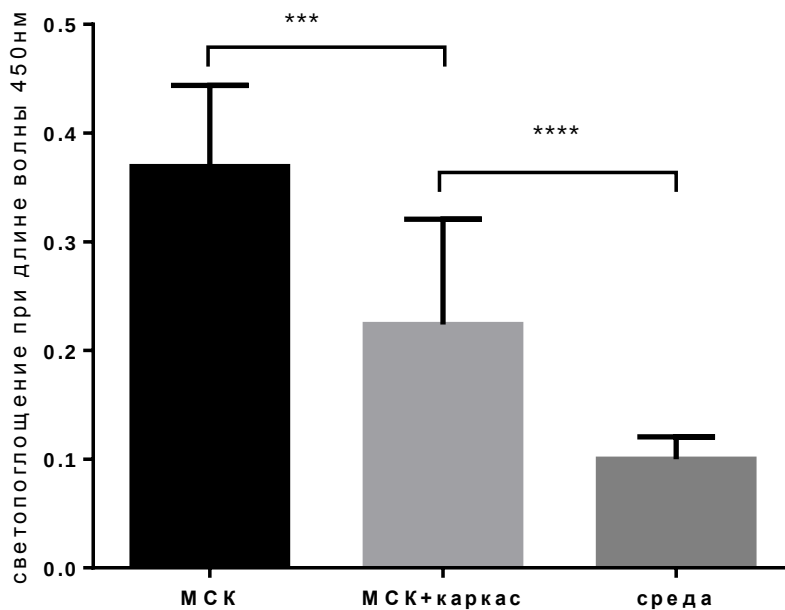


Рис 3.2.1. МТТ-тест. Оценка жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток на синтетическом трахейном каркасе до имплантации

*** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$

При морфологическом анализе образцов ТИК трахеи были выявлены хаотично расположенные синтетические волокна, к которым прикреплены ядродержащие клетки (рисунок 3.2.2.А). При окрашивании DAPI клеточные ядра, выявленные в большом количестве, активно флуоресцировали (рисунок 3.2.2.Б).

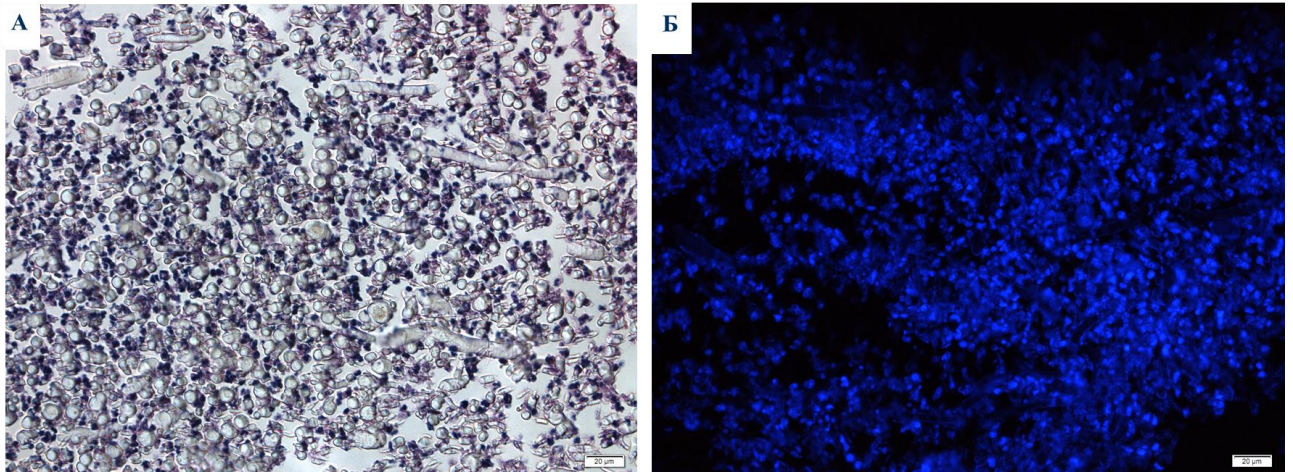


Рис. 3.2.2. Гистологическое исследование подготовленной к имплантации ТИК:
А) Окраска гематоксилин - эозином; Б) Иммуногистохимическая визуализация ядер с DAPI.

Увеличение: об. x40, ок x10.

3.3 Результаты хирургического эксперимента *in vivo*

На 20-30-е сутки после гетеротопической имплантации экспериментальные образцы были экспантированы. Структура матрикса выглядела сохранной, аморфной (рисунок 3.3.1.А). В образцах кожи вокруг имплантированного каркаса была сформирована тонкая капсула, представленная плотной волокнистой соединительной тканью с небольшим количеством сосудов и единичными сидерофагами, определялось асептическое воспаление, демаркационный вал из нейтрофилов отсутствовал (рисунок 3.3.1.Б). Обнаруживались высокофункциональные макрофаги, что было подтверждено экспрессией маннозного рецептора (рисунок 3.3.1.В) и положительной реакцией с антителами к CD68 (рисунок 3.3.1.Г). Макрофаги преимущественно локализовались вокруг имплантата и были представлены крупными клетками с интенсивно базофильной цитоплазмой и выраженными вакуолями.

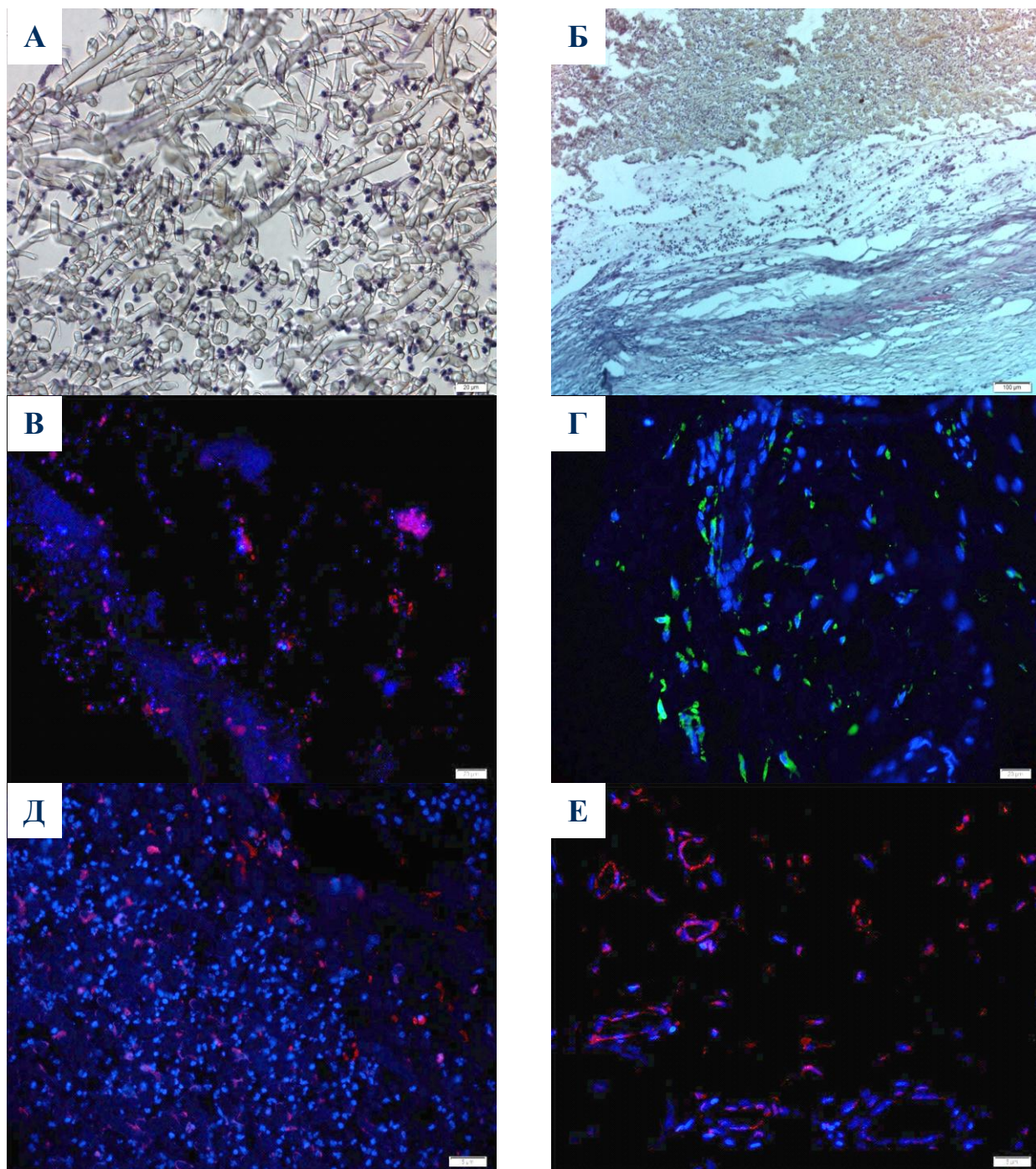


Рис. 3.3.1. Гетеротопическая имплантация ТИК.

А-Б) Окраска гематоксилин – эозином ТИК и окружающих тканей А) Ув.: об. Х40, ок. Х10; Б) Ув.: об. Х10, ок. Х10; В) Иммуногистохимическая визуализация с антителами к CD68 Ув.: об. х40, ок. х10. Г) Иммуногистохимическая визуализация с антителами к маннозному рецептору Ув.: об. х40, ок. х10. Д) Иммуногистохимическая визуализация с антителами к виментину ТИК и Е) окружающих тканей: Ув.:об. х40, ок. х10.

Иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину выявила клетки мезенхимального происхождения как в окружающих имплантат тканях, так и внутри него (рисунок 3.3.1.Д). Примечательно было то, что виментин-позитивные клетки были обнаружены и в сосудах капсулы, что характерно для эндотелиальных клеток (рисунок 3.3.1.Е).

После 1 месяца наблюдения за животными с ортотопической трансплантацией была проведена окраска микропрепаратов эксплантированной ТИК. Волокна каркаса выглядели неповрежденными, между ними были прикреплены клетки в большом количестве во всей толще графта (рисунок 3.3.2.А).

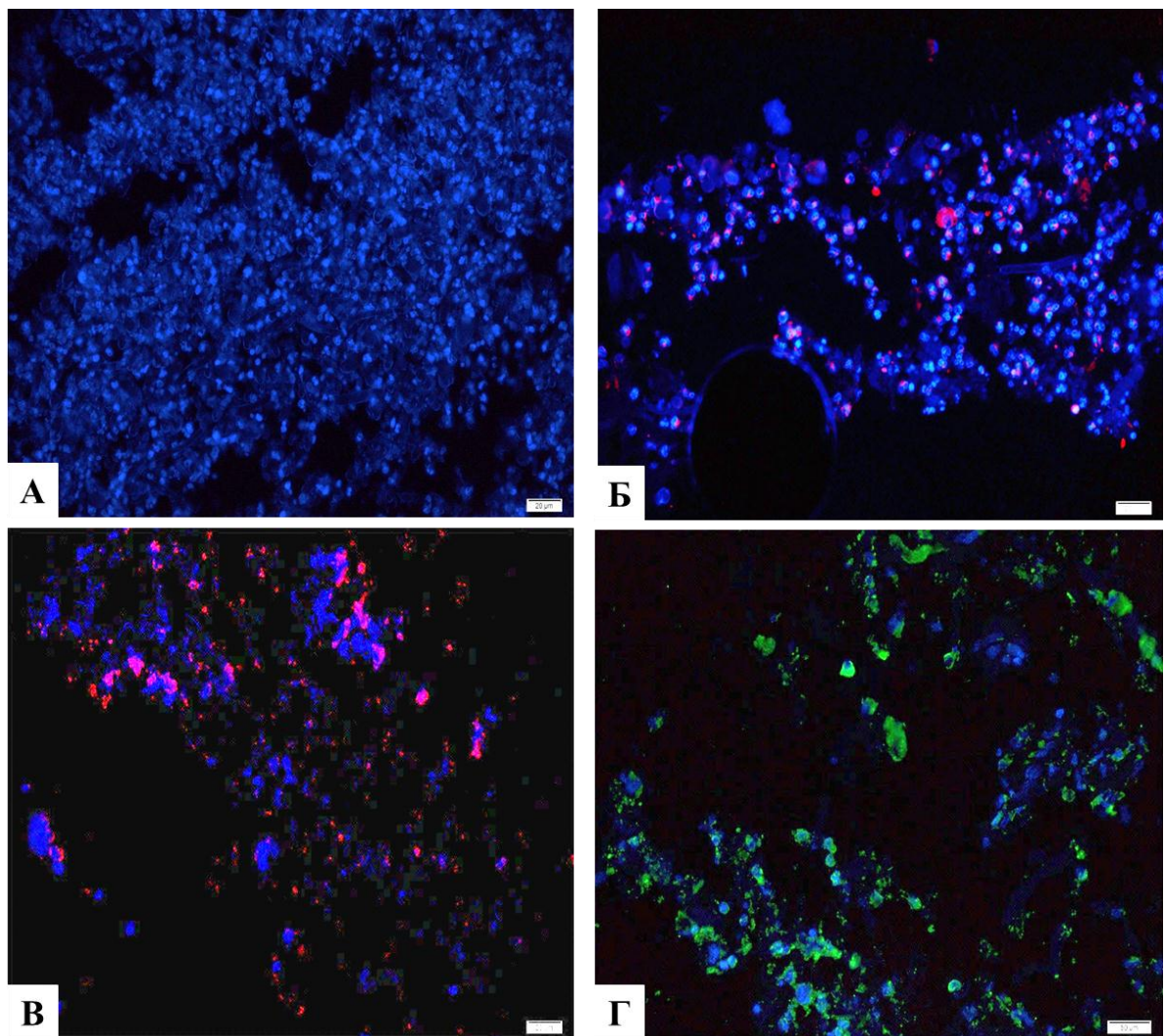


Рис 3.3.2. Ортотопическая имплантация ТИК.

А) Иммуногистохимическая визуализация ядер с DAPI. Ув.: об. x40, ок x10

Б) Иммуногистохимическая визуализация с антителами к виментину Ув.: об. x40, ок. x10.

В) Иммуногистохимическая визуализация с антителами к панкератину Ув.: об. x40, ок. x10.

Г) Иммуногистохимическая визуализация с антителами к маннозному рецептору Ув.: об. x40, ок. x10.

В образцах были выявлены клетки мезенхимального происхождения с экспрессией внутриклеточного белка виментина, хаотично локализованные в толще матрикса, преимущественно в области анастомозов (рисунок 3.3.2.Б). Группа клеток эпителиального происхождения, выявленные по реакции антител с панкератином, располагались на внутренней поверхности каркаса (рисунок 3.3.2.В). На мембранах клеток макрофагального типа выявили положительную реакцию с антителами к маннозному рецептору (рисунок 3.3.2.Г).

3.4 Резюме

Таким образом, предваряя испытания тканеинженерной конструкции трахеи на приматах, были проведены исследования, подтверждающие отсутствие цитотоксичности используемого каркаса для трахеи, сохранение функциональной активности клеток, что позволило сделать вывод о биосовместимости каркаса на клеточном уровне. Выбранный период культивирования ТИК в течение трех суток был достаточен для прикрепления и адаптации клеток к новым условиям *in vitro*.

Гистологический и иммуногистохимический анализ гетеротопических имплантатов дополнил представление о биосовместимости тканеинженерной конструкции на тканевом уровне.

Непосредственно само оперативное вмешательство не отразилось негативно на самочувствии животных. Обезьяны оставались здоровыми, активными, без признаков осложнений. Изучая аутопсийный материал было выявлено, что ТИК сохраняет свои механические свойства, заселена клетками, среди которых обнаруживаются как клетки эпителиальной природы, так и мезенхимального происхождения.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ПОДХОДА В ЛЕЧЕНИИ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ

4.1 Анализ результатов различных вариантов хирургического лечения пациентов со стенозами трахеи и разработка критериев их отбора для включения в протокол клинического исследования

За период с 2009 г. по 2014 г. был проведен ретроспективный анализ историй болезни пациентов (N = 207) с рубцовыми стенозами трахеи.

Из 207 пациентов было пролечено 57% (N = 118) мужчин и 43% (N = 89) женщин. Средний возраст пациентов составил 41 ± 18 лет, минимальный возраст – 12 лет, а максимальный – 80 год.

Этиологические факторы рубцового стеноза трахеи при ретроспективном анализе были распределены следующим образом: 45% пациентов (N = 93) имели постинтубационный стеноз, 25% человек (N = 52) имели посттрахеостомический. Постинтубационный посттрахеостомический стеноз был диагностирован в 30% случаев (N = 62). Характеристика патологии в зависимости от локализации стеноза (уровня поражения) трахеи представлена в таблице 4.1.1.

Таблица 4.1.1.

Характеристика стенозов трахеи

Локализация стеноза	Количество человек, N	Процент, %
Верхняя треть	106	51,0
Средняя треть	22	10,6
Нижняя треть	7	3,4
Протяженные и мультифокальные стенозы	72	35
Всего	207	100

Исходя из данных таблицы видно, что наиболее часто поражение затрагивало верхнюю треть трахеи, что, вероятно, обусловлено механизмом повреждения, так как вентиляционная трубка устанавливается на этом уровне.

Второе место занимали протяженные и мультифокальные стенозы. Выбор хирургической тактики составляет сложную задачу у пациентов с протяженными и мультифокальными стенозами. Им проводятся многоэтапные эндоскопические операции, которые включают в себя бужирование, стентирование, а также лазерную фотодеструкцию. Нередко такой группе пациентов устанавливают трахеостому, когда протяженность стеноза превышает половины длины всей трахеи, а другие методы уже неэффективны.

Всего в клинике было проведено 317 операций. В среднем один пациент оперировался 1,53 раза. В повторных оперативных вмешательствах нуждалось 77 (37%) пациентов, что было обусловлено рецидивом стеноза с увеличением его протяженности, трахеомалацией, развитием грануляционной ткани. Повторно оперированным пациентам было проведено в среднем 2,4 операций, а всего количество операций составило 187.

Основные методы хирургического лечения были представлены эндоскопическими манипуляциями, циркулярной резекцией и наложением трахеостомы. В таблице 4.1.2 показано распределение по видам оперативных вмешательств.

Таблица 4.1.2.

Варианты операций при лечении рубцовых стенозов трахеи

Название операции	Число операций, N	Процент операций, %
Циркулярная резекция трахеи	112	35
Наложение трахеостомы	31	10
Эндоскопические операции:	174	55
- Стентирование	26	
- Бужирование	135	
- Лазерная фотодеструкция	13	
Итого	317	100

Эндоскопическое лечение рубцовых стенозов трахеи, основанное на расширении суженных участков трахеи, проводили в 148 случаях, при этом всего было выполнено 174 эндоскопических пособий. Радикальное одномоментное лечение циркулярной резекцией трахеи с формированием прямого, циркулярного анастомоза было проведено 56 пациентам со стенозами трахеи протяженностью менее 50% длины.

Все пациенты с мультифокальными и протяженными стенозами были оперированы. Им проводили последовательные многоэтапные вмешательства. Эндоскопическое лечение было использовано в качестве самостоятельных и вспомогательных в 68% случаев (N = 49) в группе пациентов с мультифокальными и протяженными стенозами. Циркулярную резекцию трахеи в этой же группе проводили в 77,8% случаев (N = 56). Основными видами осложнений после циркулярной резекции трахеи являются: развитие грануляционной ткани (< 2%); рестеноз (< 10%); несостоятельность анастомоза (1%); дисфункция гортани (< 5%); аррозивное кровотечение (< 5%); раневая инфекция (менее 1%). Трахеостома была наложена 11 пациентам.

Проведенные результаты показали, что в лечении стенозов трахеи могут быть применены разные хирургические способы. В большинстве случаев – 63% (N = 130) пациентам проводилось одноэтапное лечение с отсутствием рецидива и прогрессирования заболевания. В повторном лечении нуждались 77 человек, из них 72 человек (93,5%) – пациенты с мультифокальным и протяженными стенозами.

Пациенты с мультифокальными и протяженными стенозами трахеи являются наиболее сложной группой больных, к которым применимо многоэтапное лечение и предполагает использование широкого спектра хирургических, в том числе эндоскопических вмешательств. Такие пациенты находятся в зависимости от больницы, поскольку вынуждены постоянно быть под присмотром врача, и лечение может быть неэффективным из-за развития целого спектра осложнений: трахеомалации, миграции стентов, рецидивов стеноза и др. Таким образом, проблема лечения пациентов с мультифокальным и протяженным рубцовым стенозом остается нерешенной, тем самым становиться актуальным поиск радикального подхода в определении тактики ведения таких пациентов.

В качестве нового способа лечения стенозов трахеи был разработан тканеинженерный подход на основе трубчатого синтетического каркаса из полиэтилентерефталата, засеянного аутологичными моноклеарными клетками.

На основании полученных данных нами были определены критерии отбора пациентов для включения в протокол клинического исследования ТИКСинКарНМККМ «Трансплантация тканеинженерной трахеи».

Критерии включения:

- Прогрессирующие мультифокальные и протяженные рубцовые поражения трахеи более 50% длины, при которых невозможно провести никакие другие виды хирургического лечения.

Критерии исключения:

- Возраст меньше 18 лет и старше 65 лет;
- Психологические состояния, являющиеся противопоказаниями для стандартных хирургических вмешательств при поражениях дыхательных путей и затрудняющие послеоперационное ведение больного, и выполнение послеоперационных рекомендаций;
- Беременность и период лактации;
- Метастазирующие опухоли;
- Любые противопоказания для проведения анестезии.

В исследовании приняли участие пациенты с мультифокальным и протяженным рубцовым поражением трахеи более 50% длины дыхательных путей, которые не могли быть излечены существующими методами. У них было отмечено прогрессивное ухудшение состояния стеноза трахеи с высоким риском развития летального исхода. По разработанному клиническому протоколу пациенты были подготовлены к оперативному вмешательству. Перед операцией были выполнены лабораторные исследования полученной тканеинженерной конструкции, которые позволили судить о ее биосовместимости с аутологичными клетками, пригодности к трансплантации. Также была дана морфофункциональная характеристика ТИКСинКарНМККМ.

4.2 Биологическая совместимость тканеинженерного синтетического каркаса с аутологичными моноклеарными клетками

4.2.1 Количественный и качественный анализ моноклеарных клеток, выделенных из костного мозга

С целью адекватной интерпретации результатов исследования биологической совместимости клеток с синтетическим каркасом определяли исходное количество выделенных МНК из костного мозга непосредственно перед процедурой засева. Среднее содержание МНК во фракции составило $2,83 \pm 0,36 \times 10^6/\text{мл}$. Жизнеспособность клеток, определенная по их окраске трипановым синим, составила в среднем 98%. Общий объем выделенной фракции моноклеарных клеток был равен в среднем $97,5 \pm 18,4$ мл.

Качественный анализ полученных МНК, выполненный с помощью иммунофенотипирования на проточном цитометре, показал, что содержание гемопоэтических стволовых клеток во фракции МНК в среднем составило $1,37 \pm 0,33\%$. Окраска клеток 7-AAD выявила $97 \pm 0,73\%$ живых клеток. Полученные результаты представлены в таблице 4.2.1.1.

Таблица 4.2.1.1.

Характеристика фракции МНК

Пациенты	Объем фракции МНК, мл	МНК $\times 10^6/\text{мл}$	Всего МНК $\times 10^8$	7-AAD, %	CD34, %	Микробиологическое исследование фракции МНК
Пациент № 1	90	2,9	2,61	97,99	1,86	Стерильно
Пациент № 1 (ретрансплантация)	90	2,598	2,33	95	2,34	Стерильно
Пациент № 2	90	4,24	3,82	96,78	1,6	Стерильно
Пациент № 2 (ретрансплантация)	90	2,642	2,37	98,65	0,62	Стерильно
Пациент № 3	135	1,791	2,41	95	0,37	Стерильно
Пациент № 4	90	2,789	2,5	98,26	1,45	Стерильно
Итого	$97,5 \pm 18,4$	$2,83 \pm 0,36$	$2,67 \pm 0,26$	$97 \pm 0,73$	$1,37 \pm 0,33$	

4.2.2 Жизнеспособность клеток, засеянных на синтетический каркас трахеи

Для определения биологической совместимости засеянных клеток на синтетическом каркасе исследовали жизнеспособность и метаболическую активность образцов ТИКСинКарНМККМ *in vitro* перед трансплантацией реципиентам и проводили гистологическое исследование образцов тканеинженерной конструкции, полученных при фиксации *in situ*.

В серии экспериментов, проводимых после трех суток культивирования ТИКСинКарНМККМ, была проанализирована жизнеспособность клеток, засеянных на синтетический трахейный каркас.

Исследование образцов ТИКСинКарНМККМ проводили дважды: до операции и во время операции, когда размеры графта были адаптированы к анатомическим особенностям каждого пациента.

В среднем жизнеспособность клеток на каркасе составила $85,83 \pm 6,90\%$ (мин. 66,85%, макс. 103%) до имплантации. Результаты МТТ-теста образцов ТИКСинКарНМККМ до трансплантации представлены на рисунке 4.2.2.1

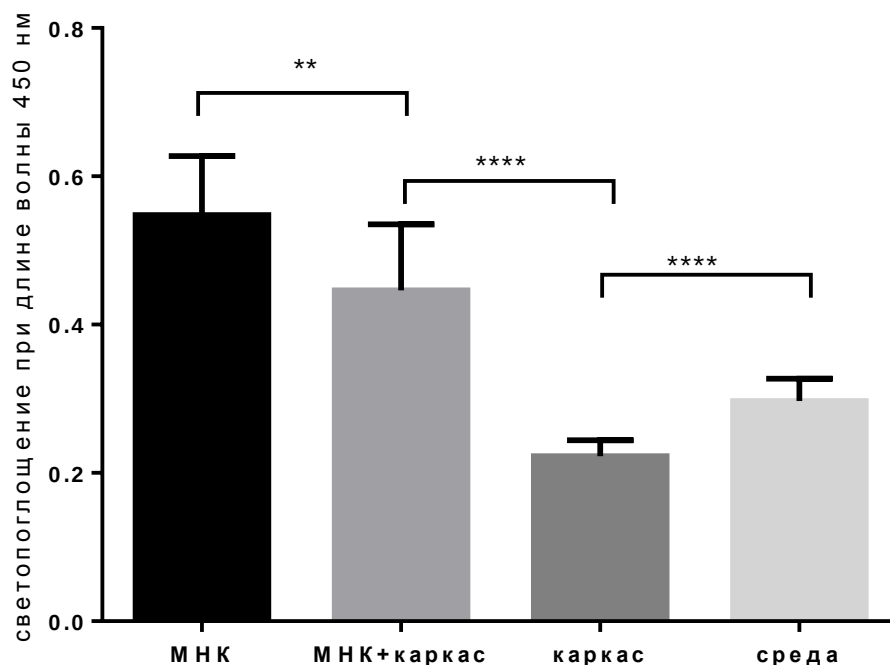


Рис. 4.2.2.1 МТТ-тест. Оценка жизнеспособности моноклеарных клеток на синтетическом трахейном каркасе до имплантации

** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$

Полученные до трансплантации значения оптической плотности, измеренные в лунках, содержащих образцы графта, были сопоставимы со значениями оптической плотности лунок, содержащих культивированные 72 часа МНК (позитивный контроль) и значительно превосходили значения оптической плотности в образцах синтетического каркаса без клеток (негативный контроль), $p < 0,05$.

Аналогичным образом были исследованы образцы ТИКСинКарНМККМ, отсеченные от основной части во время операции. Жизнеспособность клеток составила $103,46 \pm 6,38\%$ (мин. 89,1%, макс. 122%). При сравнении образцов из опытной и контрольной групп было установлено, что результаты МТТ-теста не отличаются от позитивного контроля и превосходят результаты МТТ-теста негативного контроля $p < 0,05$. Данные МТТ-теста, проведенного после имплантации трансплантата, представлены на рисунке 4.2.2.2.

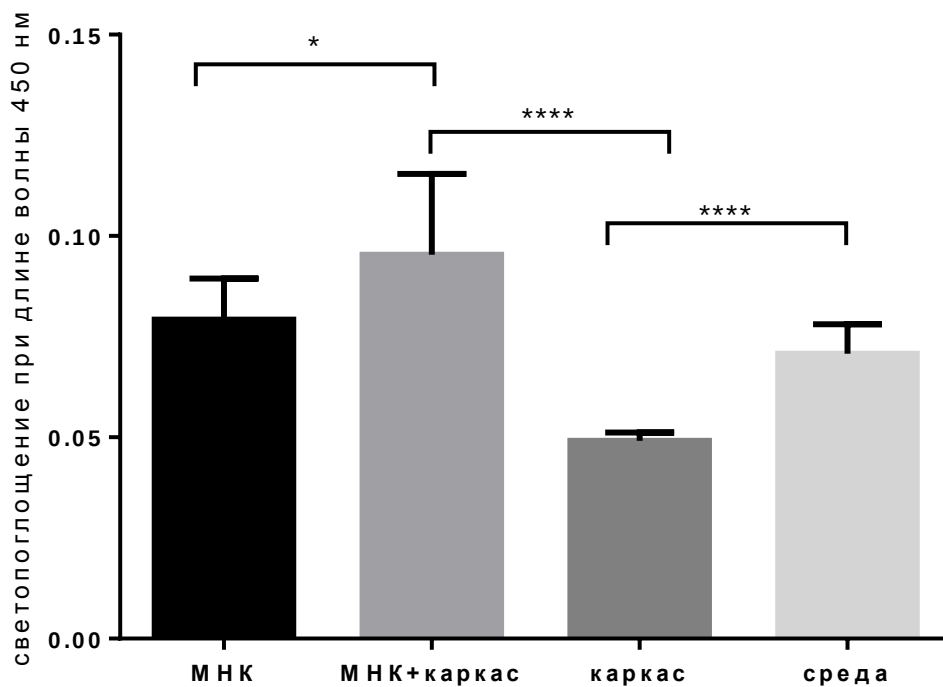


Рис. 4.2.2.2. МТТ-тест. Оценка жизнеспособности моноклеарных клеток на синтетическом трахейном каркасе после имплантации.

** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

Дифференциальное выявление живых (флуоресценция с кальцеином) и мертвых (флуоресценция с гомодимером этидия) клеток, основанное на активном транспорте кальцеина внутрь живых клеток и пассивном транспорте гомодимера этидия внутрь мертвых клеток, позволило визуализировать живые клетки во время культивирования. Живые клетки (окрашены в зеленый цвет) составили более $70 \pm 5 \%$ от общего числа клеток, засеянных на каркас (рисунок 4.2.2.3).

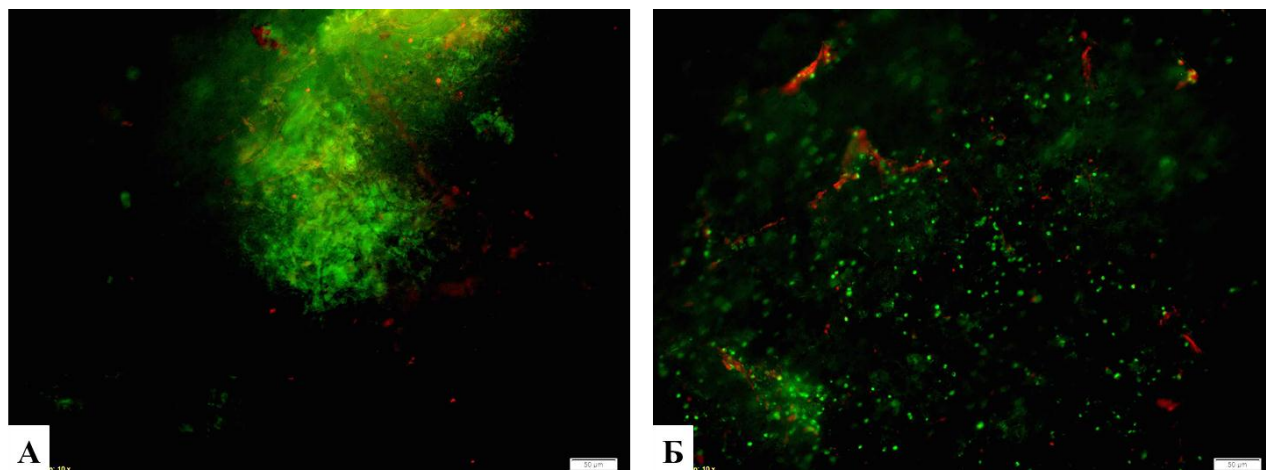


Рис. 4.2.2.3 Окраска кальцеином и гомодимером этидия.

А – проксимальная часть. Б – дистальная часть. Ув.: $\times 10$

Таким образом, полученные результаты дают все основания сделать вывод о том, что ТИКСинКарНМККМ содержала жизнеспособные, метаболически активные клетки, а синтетический каркас не был цитотоксичен.

4.3 Морфофункциональная характеристика тканеинженерной конструкции трахеи

4.3.1 Гистологическое строение и иммуногистохимическое описание тканеинженерной конструкции трахеи

Морфологическое исследование образцов ТИКСинКарНМККМ, полученных интраоперационно при ее фиксации в ортотопическом положении, проводили в послеоперационном периоде. Окраска гематоксилином и эозином образцов графта трахеи выявила мононуклеарные клетки округлой или овальной формы, адгезированные между волокнами каркаса, имеющего пористое строение (рисунок 4.3.1.1.А-Б). Преимущественная локализация клеток была по краям образцов, а не

в толще. В полученных образцах не было видно пикнотических ядер, что указывало на отсутствие апоптоза клеток. Дополнительно для визуализации клеток на каркасе было выполнено окрашивание DAPI ТИКСинКарНМККМ (рисунок 4.3.1.1.В). В толще тканеинженерной конструкции трахеи ядра клеток, визуализированные DAPI активно флуоресцировали и выявлялись в большом количестве.

Клетки, выявленные в графте, обладали пролиферативной активностью, о чем свидетельствовала экспрессия маркера пролиферации – Ki-67, при этом пролиферативный индекс составил 40% (рисунок 4.3.1.1.Г).

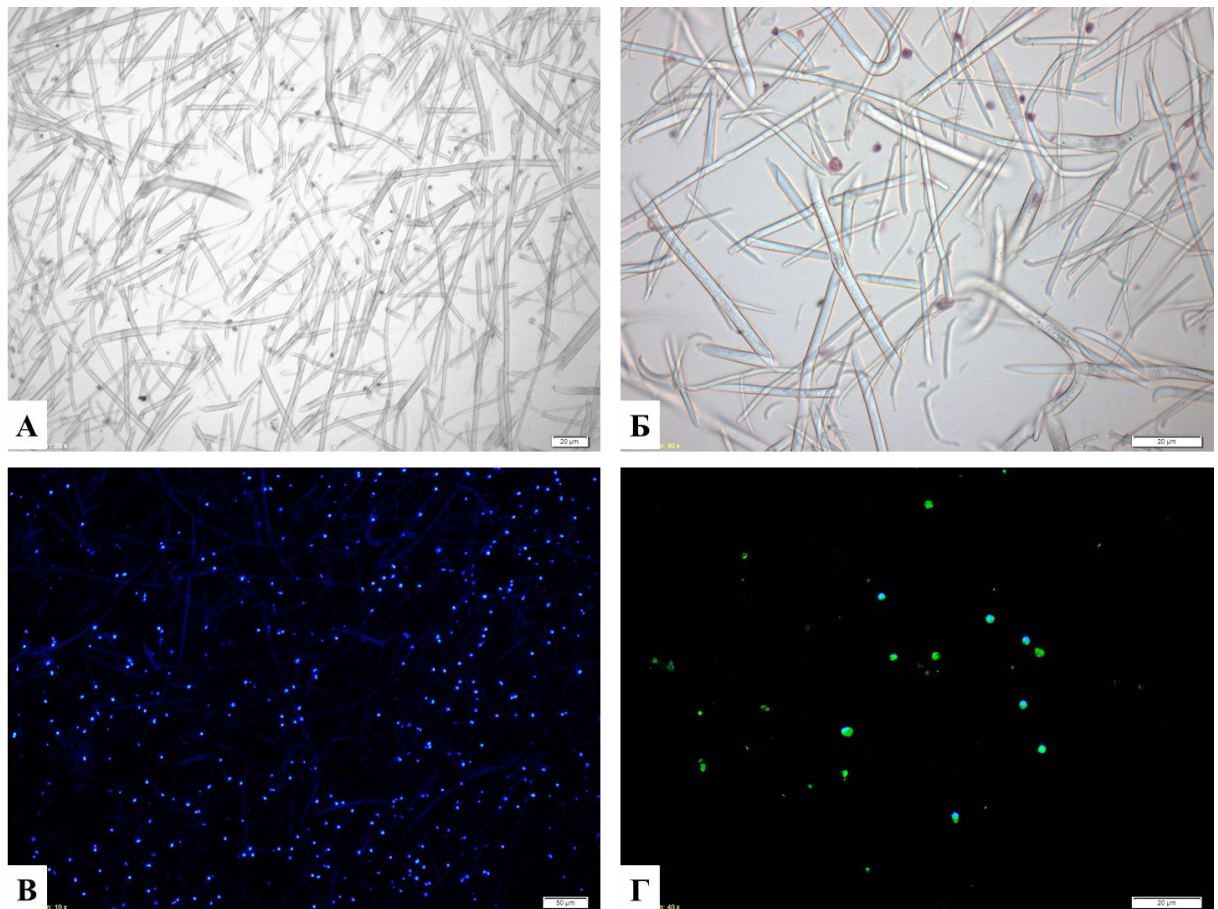


Рис. 4.3.1.1 Синтетический каркас, засеянный мононуклеарными клетками.

А-Б: – гематоксилин и эозин: Ув.: А – x20; Б – x40; В – флуоресценция DAPI: Ув.: x10;

Г – иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67: Ув.: x40.

4.3.2 Цитоморфологические изменения клеток на синтетическом каркасе *in vivo*

Для изучения дифференцировочного потенциала клеток на синтетическом каркасе *in vivo* проводили исследования цитологических образцов, полученных из смывов бронхоальвеолярного лаважа у пациентов во время бронхоскопии. Обнаружено, что на 3-й день после операции в области анастомозов появились скопления мезенхимальных клеток. На рисунке 4.3.2.1.А представлены изображения активно делящихся и пролиферирующих мезенхимальных стволовых клеток.

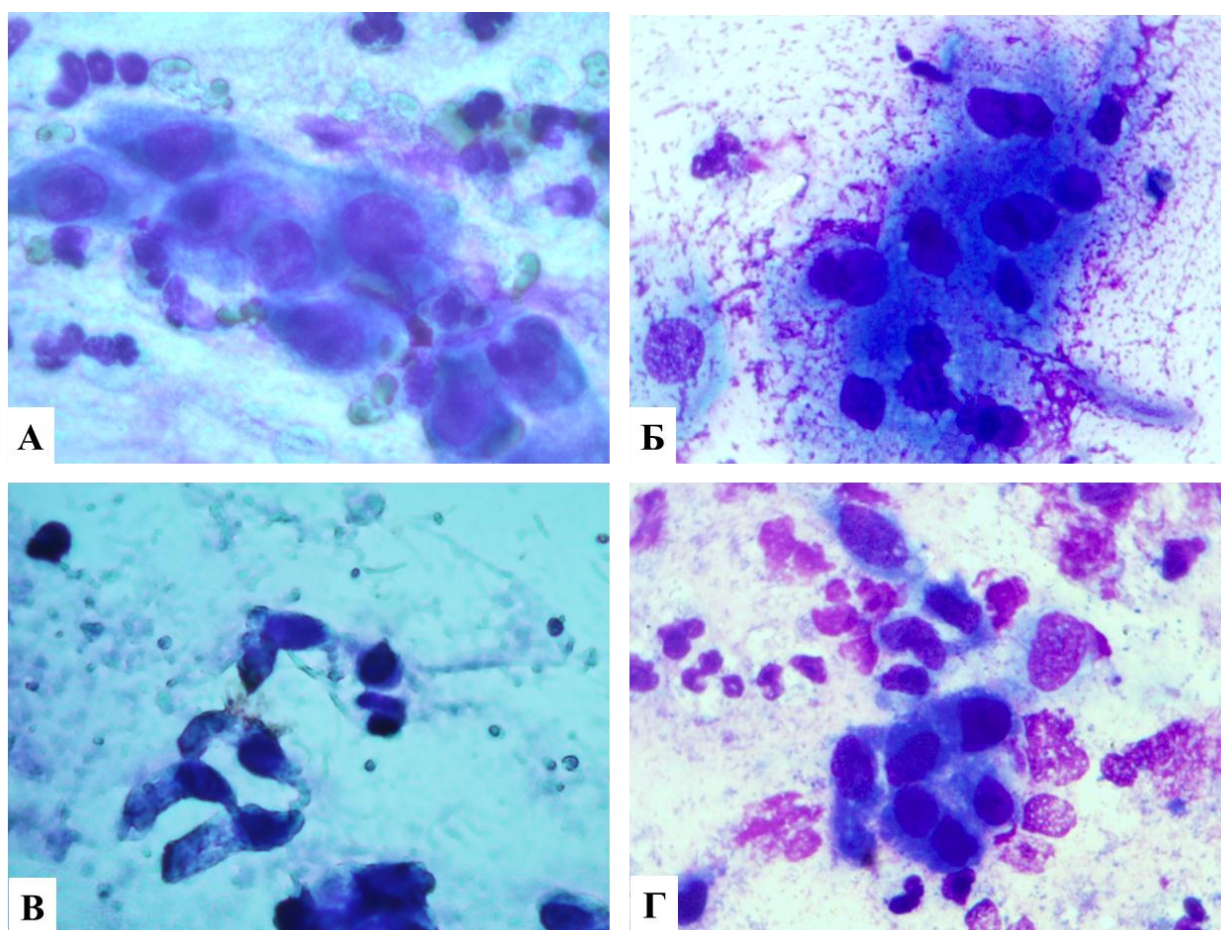


Рис 4.3.2.1 Цитологическое исследование смывов бронхиального лаважа

Окраска Романовский-Гимза. А – скопление мезенхимальных стволовых клеток. Нижний анастомоз. Б – Группы клеток метапластического эпителия. В – группы клеток реснитчатого эпителия. Г – Группы клеток железистого эпителия. Ув.: x100

На 6-8 сутки после трансплантации были обнаружены клетки метапластического эпителия, которые образовывали группы или пласты (рисунок 4.3.2.1.Б). На 10-14 сутки послеоперационного периода в цитологических образцах были выявлены скопления клеток реснитчатого эпителия. Представленные клетки имели базофильную цитоплазму и выраженные нуклеолы в ядре (рисунок 4.3.2.1.В). При исследовании образцов на 20-е сутки послеоперационного периода было обнаружено появление как кубического, так и реснитчатого эпителия. Клеточные ядра имели округлую либо овальную форму, ровные контуры с равномерным распределением хроматина (рисунок 4.3.2.1.Г).

Таким образом, результаты исследования морфофункционального взаимодействия моноклеарных клеток и синтетического каркаса выявили, что засеянные на каркас клетки остаются живыми, сохраняют метаболическую и пролиферативную активность до и после трансплантации ТИКСинКарНМККМ. Полученные *in vitro* и *in vivo* данные свидетельствуют о биосовместимости клеток с синтетическим каркасом и указывают на готовность ТИКСинКарНМККМ к трансплантации. Гистологическое исследование подтвердило, что на синтетическом каркасе трахеи адгезируются ядродержащие живые клетки.

Результаты бактериологического исследования показали стерильность культивируемой трахеи, используемых сред и промывочных растворов, отсутствие бактериологической, грибковой и микоплазменной контаминаций.

Цитоморфологическое исследование образцов смывов имплантированной ТИКСинКарНМККМ, полученных из бронхоальвеолярного лаважа, выявило динамику клеточной популяции и появление клеток дыхательного эпителия.

4.4 Мобилизация стволовых клеток и биологически активные вещества

4.4.1 Изучение мобилизации стволовых клеток под действием стимулирующей терапии

Тканеинженерный подход в лечении заболеваний включает в себя не только разработку способа восстановления поврежденной ткани или органа с помощью тканеинженерных конструкций, но и создание оптимального микроокружения для

дальнейшего приживления графта *in situ*. Основываясь на свойствах стволовых клеток, а именно, хоминг-эффекте этих клеток к месту повреждения, дополнительно всем пациентам проводилась терапия, направленная на мобилизацию стволовых клеток и усиления процессов регенерации. Стимулирующие препараты Г-КСФ и эритропоэтин (буст-терапия) вводили по представленной схеме подкожно каждому пациенту (рисунок 2.11.2.1): однократно за 2 дня до трансплантации и после операции через день на протяжении 14 дней. Учитывая, что препараты оказывают влияние на гемопоэз, у всех пациентов ежедневно контролировали состав периферической крови.

Анализ состава периферической крови выявил лейкоцитоз, который наблюдался у пациентов в послеоперационном периоде на всем протяжении введения препарата Г-КСФ и составил в среднем $20,21 \pm 1,120 \times 10^6/\text{л}$ (минимально $6,54 \times 10^6/\text{л}$ и максимально $48,42 \times 10^6/\text{л}$) ($p < 0,05$). Учитывая, что лейкоцитоз мог быть результатом не только проводимой стимулирующей терапии, но и признаком системного воспалительного ответа, то для дифференциальной диагностики всем пациентам ежедневно исследовали уровень С-реактивного белка (СРБ) и выполняли прокальцитониновый тест.

Лейкоцитоз сопровождался увеличением СРБ в среднем до $99,50 \pm 12,09$ ($p < 0,05$) с постепенным снижением его уровня к 12-14 суткам послеоперационного периода. В раннем послеоперационном периоде (1-6 сутки) уровень прокальцитонинового теста составил 0,5 нг/мл. Бактериологические посевы биологических жидкостей были отрицательными. Полученные результаты исключали инфекционный воспалительный процесс.

Помимо Г-КСФ пациенты получали препараты эритропоэтина. Поскольку эритропоэтин стимулирует эритропоэз, то может возникнуть эритроцитоз, и, возможно, тромбоцитоз, поэтому всем пациентам проводился тщательный контроль уровня эритроцитов и тромбоцитов. Во избежание негативных последствий приема препарата, таких как усиление прокоагулянтного эффекта и нарушение гемореологии, проводили регулярный контроль за состоянием пациента и назначали антиагрегантную терапию. В послеоперационном периоде

уровень эритроцитов у пациентов составил в среднем $3,72 \pm 0,05 \times 10^{12}/л$ ($p < 0,05$), гемоглобина – $105,2 \pm 2,07$ г/л ($p < 0,05$). Анемия легкой степени была связана с ранним послеоперационным периодом и объемом проведенного оперативного вмешательства. В послеоперационном периоде был выявлен тромбоцитоз, в среднем – $375,5 \pm 31,85 \times 10^9/л$ ($p < 0,05$), преимущественно на второй недели буст-терапии, который не был критичным и не требовал отмены препарата эритропоэтина.

Для анализа мобилизации столовых клеток проводили определение количества и иммунофенотипирование фракции МНК, выделенных из периферической крови. Исходный уровень клеток в моноклеарной фракции составил $3442 \times 10^3/мкл$. Наибольшее количество МНК из периферической крови было получено на 10 - 14 дни после операции: $8653,4 \times 10^3/мкл$ и $8257,8 \times 10^3/мкл$, соответственно. Было отмечено, что после значительного повышения количества МНК на 10-е сутки, наблюдалось лавинообразное снижение на 12-е сутки, вероятно, обусловленное истощением механизмов регуляции синтеза и выброса клеток в кровотоки на фоне проводимой стимулирующей терапии. Количественное изменение фракции МНК представлено в средних числах на рисунке 4.4.1.1.

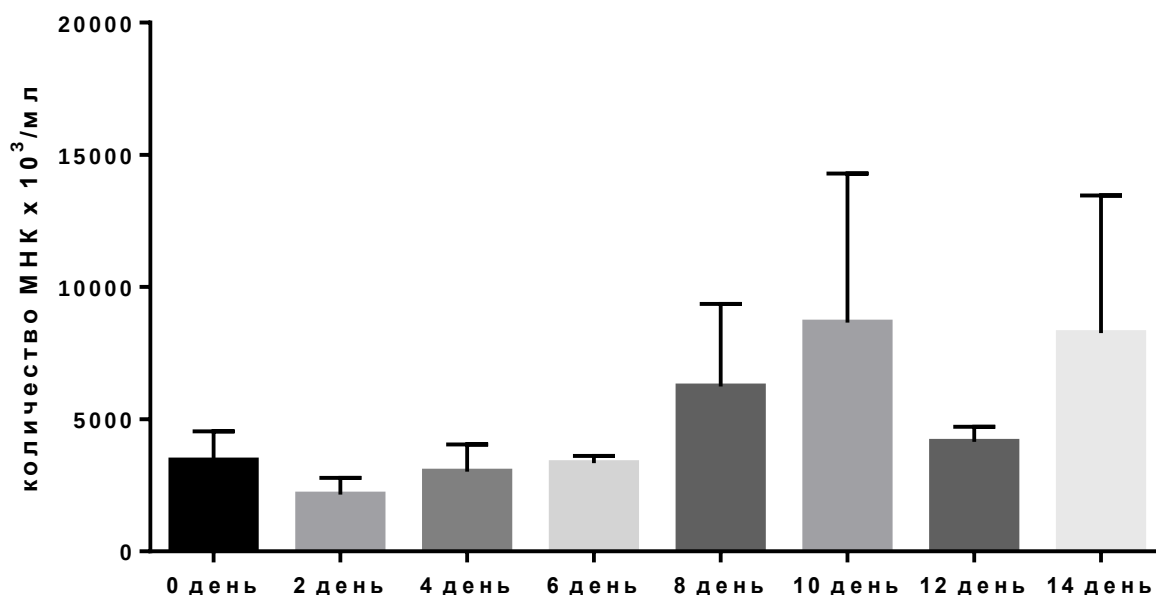


Рис. 4.4.1.1 Динамика количества моноклеарных клеток в периферической крови в послеоперационном периоде.

Определение иммунофенотипа гемопоэтических стволовых клеток проводили по наличию антигена CD34. В нестимулированных условиях количество CD34⁺ клеток составило 0,02% среди МНК периферической крови. Лечение Г-КСФ привело к существенному увеличению содержания CD34⁺ клеток, с пиковым значением на 8-й день (0,33%) после начала терапии. Динамика относительного содержания CD34⁺ клеток в периферическом русле, как до операции, так и в послеоперационном периоде представлена на рисунке 4.4.1.2.

Буст-терапия приводила не только к мобилизации гемопоэтических стволовых клеток, но и вызывала повышение в кровотоке пула МСК, которые идентифицировали по экспрессии маркеров CD105, CD73, CD90 и отсутствию экспрессии маркеров CD34 и CD45. Для определения фенотипа МСК исследовали гистограммы с использованием логических ограничений в зонах негативных по CD34.

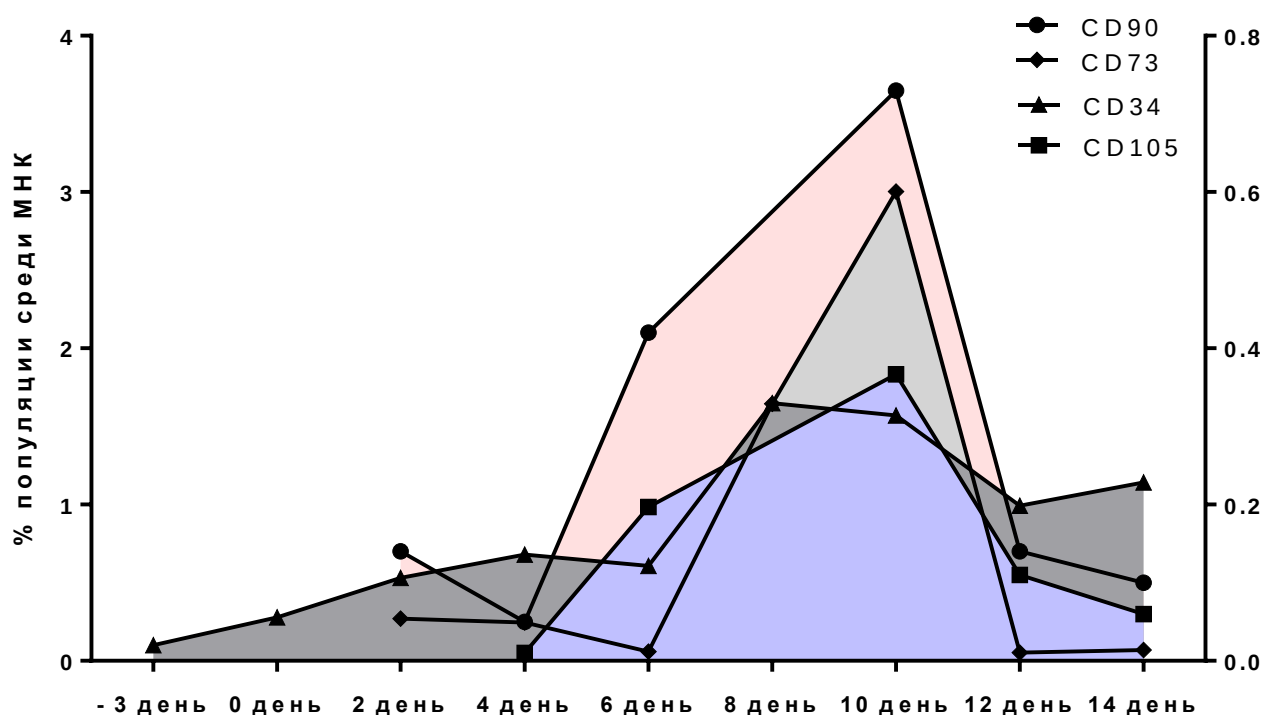


Рис. 4.4.1.2. Динамика относительного содержания CD34⁺, CD105⁺, CD 90⁺, CD73⁺ - клеток во фракции мононуклеарных клеток, выделенной из периферической крови. $p=0,0004$ по критерию Фридмана.

До операции популяция клеток CD34-CD105+ в кровотоке не выявлялась. На 4 сутки послеоперационного периода на фоне проводимой терапии CD34-CD105+ клетки были обнаружены в количестве 0,01% среди МНК периферической крови. Наибольшее содержание этих клеток во фракции было зафиксировано на 10 день – 0,367% (рисунок 4.4.1.2).

Популяция CD34-CD90+ клеток была выявлена в кровотоке на 2 день (0,14%) после операции и начала терапии. Максимальная концентрация была отмечена на 10-е сутки и равна 0,73% среди всей фракции МНК (рисунок 4.4.1.2).

Популяцию клеток CD34-73+ определяли в периферической крови на всем протяжении буст-терапии, начиная со 2 дня после операции (0,27% среди МНК). Максимальный уровень был зафиксирован на 10-е сутки послеоперационного периода и составил 3,003% (рисунок 4.4.1.2). Корреляционный анализ позволил оценить, есть ли взаимосвязь между повышением фракции МНК и популяциям разных клеток. Были выявлены следующие положительные связи: повышение популяции CD34+ клеток было прямо пропорционально количеству МНК, $r = 0,7834$, $p < 0,05$, и коррелировало с повышением CD 73+ клеток, $r = 0,7823$, $p < 0,05$. Важно также отметить, что повышения популяций клеток CD73+, CD105+, CD90+ находятся в тесной связи (коэффициент Пирсона составил для пары CD73 – CD90: $r = 0,8486$, $p < 0,05$, для пары CD105 – CD90: $r = 0,9877$, $p = 0,0016$). Таким образом, до операции, равно как и в раннем послеоперационном периоде, у пациентов были обнаружены популяции клеток с фенотипом CD 34+CD45+CD105-CD73-CD90-, характерным для гемопоэтических стволовых клеток (рисунок 4.4.1.3).

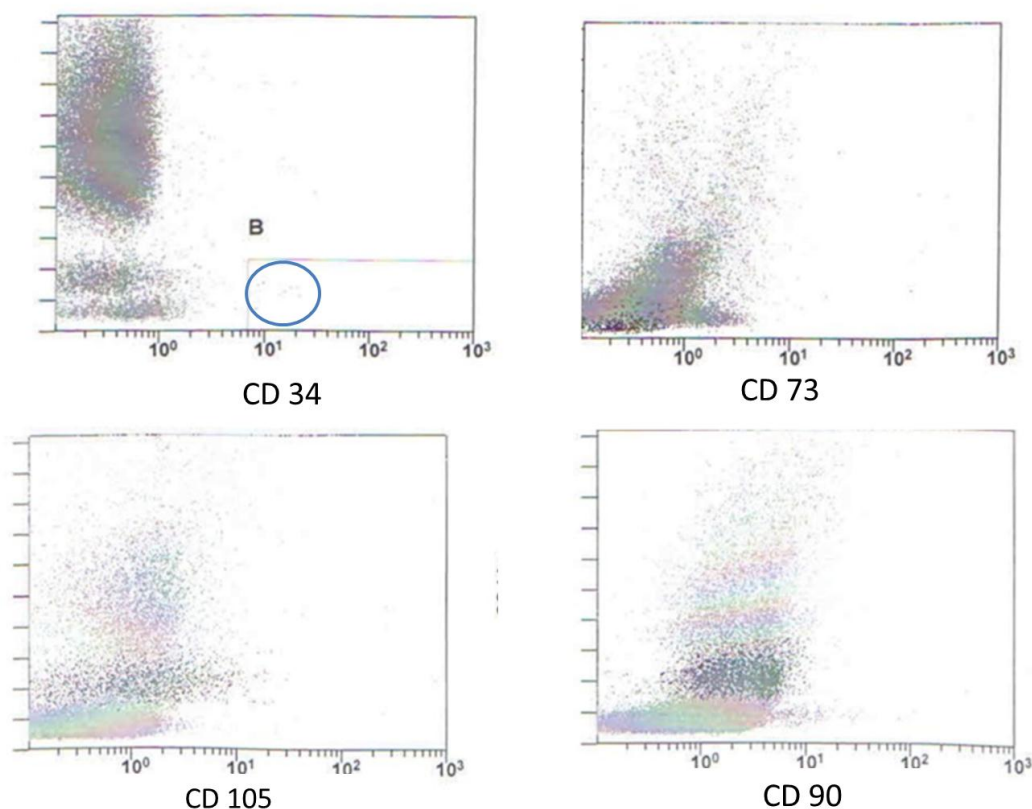


Рис. 4.4.1.3 Гистограмма распределения клеток периферической крови с использованием моноклональных антител против CD34, CD 73, CD105, CD 90.

Проточная цитометрия

В послеоперационном периоде, между 2 и 14 днем после трансплантации, было отмечено повышение количества МНК, увеличение популяции гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови и появление популяции клеток с фенотипом CD34-CD45-CD11b-CD14-CD105+CD73+CD90+, характерным для МСК. Все эти изменения имели статистическую достоверность, $p = 0,0004$ по критерию Фридмана. Известно, что в норме МСК циркулируют в периферической крови в ничтожно малых количествах, что затрудняет их выявление (Kauser K., Zeiher A.M., 2007). Обнаружение мезенхимальных стволовых клеток свидетельствовало об их мобилизации и активации. Гистограммы полученных клеток представлены на рисунке 4.4.1.4.

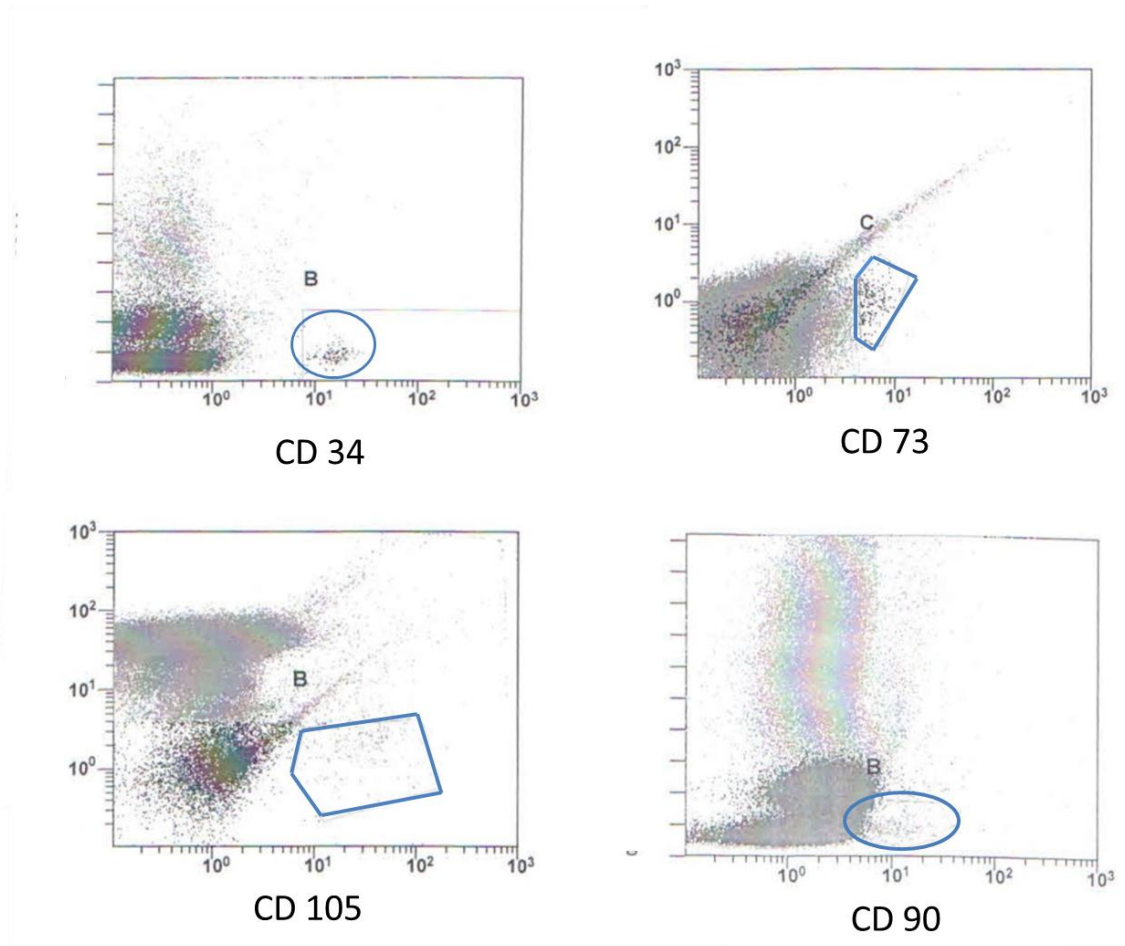


Рис. 4.4.1.4 Гистограмма распределения клеток периферической крови с использованием моноклональных антител против CD34, CD 73, CD105, CD90.

Проточная цитометрия

4.4.2 Исследование динамики цитокинов, молекул адгезии и факторов роста у пациентов в послеоперационном периоде

Особое внимание было уделено изучению динамики биологически активных веществ у пациентов в послеоперационном периоде, так как они оказывают влияние на мобилизацию и активацию клеток, стимулируют пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток, создавая микроокружение в месте повреждения. Нами были проанализированы с помощью иммуноферментного анализа следующие биологически активные вещества: TNF- α , IL-1, IL-2, VCAM, ICAM, E-selectin, VEGF и эритропоэтина в периферической крови. Динамика концентраций TNF- α , IL-1, IL-2 представлена на

рисунке 4.4.2.1. Динамика концентраций VCAM, ICAM, E-selectin, VEGF и эритропоэтина представлена на рисунке 4.4.2.2.

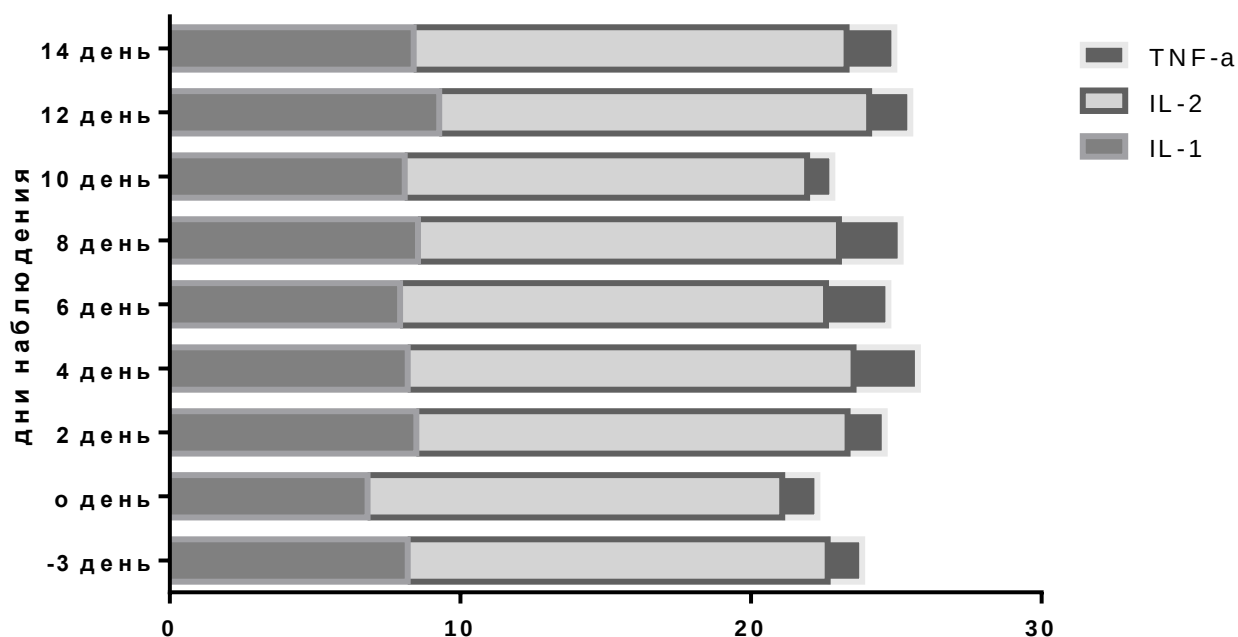


Рис. 4.4.2.1. Динамика относительного содержания TNF-α, IL-1, IL-2 в сыворотке крови. $p < 0,0001$ по критерию Фридмана.

Уровень TNF-α в сыворотке до операции и начала стимулирующей терапии составил 1,186 пг/мл (N 5-66 пг/мл). Результаты исследования уровня TNF-α в сыворотке в послеоперационном периоде выявили его повышение в 2 раза до 2,22 пг/мл на 4-8 сутки. Второй пик повышения цитокина TNF-α до 1,648 пг/мл наблюдали на 12-14 сутки.

Уровень сывороточного IL-1 до операции и начала стимулирующей терапии составил 8,19 пг/мл (N 0-3,9 пг/мл), в первые дни после операции уровень IL-1 поднялся до 8,5 пг/мл. Наиболее высокий уровень IL-1 после операции был отмечен на 12-е сутки на фоне стимулирующей терапии и составил 9,27 пг/мл.

Результаты сравнения уровня IL-2 в сыворотке в разные дни до и после операции выявили, что до операции концентрация IL-2 составила 14,46 пг/мл (N 0-5,0 пг/мл). В послеоперационном периоде было отмечено незначительное возрастание концентрации IL-2 на 4-е сутки до 15,34 пг/мл, и на 14-й день до 14,89 пг/мл. Все изменения концентраций TNF-α, IL-1, IL-2 имели статистическую достоверность, $p < 0,0001$ по критерию Фридмана.

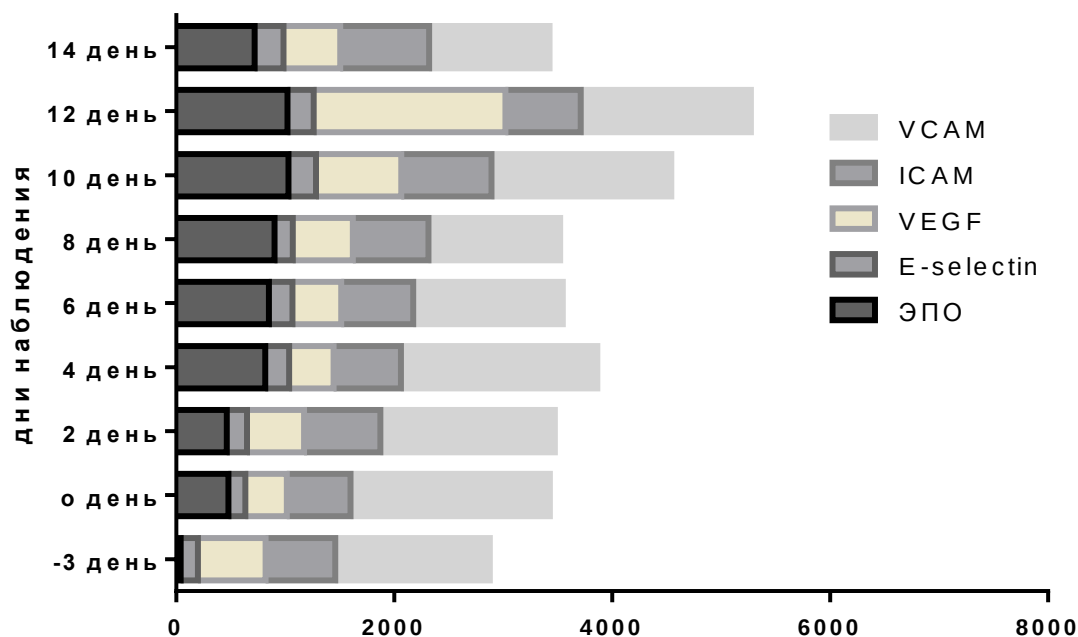


Рис. 4.4.2.2. Динамика относительного содержания VCAM, ICAM, E-selectin, VEGF и эритропоэтина в сыворотке крови. $p < 0,0001$ по критерию Фридмана.

До операции и проведения стимулирующей терапии уровень Е-селектина составил 157,25 нг/мл (N 21-186 нг/мл). Изменения концентрации Е-селектина в послеоперационном периоде были существенными в период между 10 и 14 днем, максимальная концентрация составила 253,3 нг/мл и 265,02 нг/мл, соответственно.

Концентрация VCAM в сыворотке до операции составила 1419, нг/мл (N 400,6 - 1340,8 нг/мл). В послеоперационном периоде повышение уровня VCAM было отмечено на 4-е сутки до 1803,89 нг/мл, и на 10-е сутки до 1650,45 нг/мл.

Уровень ICAM был повышен до 556,2 нг/мл на 10 день и до 615,38 нг/мл на 14 день после операции, по сравнению с исходным уровнем 479,6 нг/мл (N 52,7-1047,2 нг/мл).

Концентрация сывороточного VEGF до операции и проведения стимулирующей терапии составила 620,72 пг/мл (N 92-390 пг/мл). В послеоперационном периоде было отмечено постепенное повышение уровня VEGF с максимумом до 1761,25 пг/мл на 12-е сутки.

В дооперационном периоде перед началом культивирования базовый уровень эндогенного эритропоэтина соответствовал 42,06 мМЕ/мл

(N 2,7-42 мМЕ/мл). В послеоперационном периоде на фоне проводимой буст-терапии выявлено постепенное повышение его содержания, с максимумом на 10-е сутки 1031 мМЕ/мл, с достоверным изменением концентрации в динамике, $p < 0,01$.

Все изменения концентраций VCAM, ICAM, E-selectin, VEGF и эритропоэтина в сыворотке крови имели статистическую достоверность, $p < 0,0001$ по критерию Фридмана

Интересным стали результаты корреляционного анализа изменений биологических активных веществ и популяций стволовых клеток. Повышение концентрации эритропоэтина прямо пропорционально увеличению пула CD34+-клеток ($r = 0,7834$, $p < 0,05$). Повышение уровня ICAM сопровождалось повышением фракции МНК и пула CD34+-клеток: коэффициент корреляции составил: $r = 0,7545$, $p < 0,05$ и $r = 0,7123$, $p < 0,05$, соответственно. Выявлена положительная связь возрастания уровня ICAM с повышением уровня Е-селектина ($r = 0,7298$, $p < 0,05$) Эти данные могут свидетельствовать об эндотелиальной активации. Отмечена обратная пропорциональная связь между увеличением концентраций IL-2 и популяциями МСК. Коэффициент корреляции для пары IL-2 – CD90 составил $r = -0,9370$, $p < 0,05$, для пары IL-2 – CD73 составил $r = -0,8538$, $p < 0,05$ и для IL-2 – CD105: $r = -0,9767$, $p < 0,001$, соответственно.

Таким образом, результаты проточной цитометрии выявили мобилизацию как гемопоэтических стволовых клеток, так и мезенхимальных стволовых клеток под действием стимулирующей терапии Г-КСФ и эритропоэтином. Обнаружение МСК в периферическом русле может способствовать усилению процессов регенерации в области проведенного оперативного вмешательства за счет хоминг-эффекта данных клеток. Сравнительный анализ концентраций провоспалительных цитокинов, молекул адгезии и факторов роста выявил признаки развития цитокиновой реакции в периферическом русле. Повышение Е-селектина, ICAM, VCAM, косвенно может свидетельствовать об эндотелиальной активации. Повышение концентраций VEGF, эритропоэтина, обладающих противовоспалительным, ангиогенным и антиапоптотическим действиями, может означать активацию регенеративных процессов.

4.5 Резюме

Проведенный ретроспективный анализ результатов хирургического лечения пациентов со стенозами трахеи позволил распределить пациентов по полу и возрасту, охарактеризовать группы пациентов в зависимости от хирургической тактики и вида оперативного вмешательства. Наиболее часто поражение затрагивало верхнюю треть трахеи, что, вероятно, обусловлено механизмом повреждения, так как вентиляционная трубка устанавливается на этом уровне.

Второе место занимали протяженные и мультифокальные стенозы. Проблема лечения пациентов с мультифокальным и протяженным рубцовым стенозом до сих пор остается нерешенной, что сохраняет интерес к поиску радикального подхода в тактике ведения таких пациентов.

На основании полученных данных были определены критерии отбора пациентов для включения в протокол клинического исследования ТИКСинКарНМККМ «Трансплантация тканеинженерной трахеи». Было решено, что в протокол клинического исследования необходимо включать пациентов с прогрессирующими мультифокальными и протяженными рубцовыми поражениями трахеи более 50% длины, при которых невозможно провести никакие другие виды хирургического лечения.

Тканеинженерная конструкция трахеи была представлена синтетическим каркасом, изготовленным индивидуально для каждого пациента, и засеянная аутологичной фракцией МНК костного мозга. В ротационном биореакторе на протяжении 72 часов засеянный клетками синтетический каркас культивировали в условиях CO₂-инкубатора. После окончания культивирования через 72 часа тканеинженерная конструкция трахеи была имплантирована пациентам. Перед тем как выполнить трансплантацию проводили морфофункциональные исследования ТИКСинКарНМККМ *in vitro*. Анализ результатов показал, что засеянные на синтетический каркас МНК сохраняют свою жизнеспособность, обладают метаболической и пролиферативной активностью. Оценка состояния клеток в образцах, которые были получены интраоперационно, показала сохранение жизнеспособности клеток, метаболической активности. Полученные данные

свидетельствовали также о биологической совместимости клеток с синтетическим каркасом, и позволили нам судить о пригодности тканеинженерной конструкции к трансплантации.

Трансплантированная ТИКСинКарНМККМ, конечно же, не была трахеей в обычном понимании, так как не имела ни сосудов, ни характерного цитологического и гистологического строения. Однако опираясь на существующую гипотезу, основанную на том, что мультифункциональное воздействие микроокружения в месте имплантации может стимулировать развитие специфической ткани, было важно изучить динамику морфологических изменений клеток в составе тканеинженерной конструкции трахеи *in vivo* в разные сроки наблюдения.

Цитологический анализ образцов имплантированной ТИКСинКарНМККМ, полученных со смывов бронхоальвеолярного лаважа, показал появление специфичных клеток, характерных для эпителия дыхательных путей, на 10-14 сутки после операции.

Для усиления регенеративных процессов пациентам проводили стимулирующую терапию препаратами Г-КСФ и эритропоэтином. Анализ состава периферической крови в послеоперационном периоде выявил лейкоцитоз. На фоне проводимой терапии была отмечена мобилизация стволовых клеток в периферическом русле. Особенно следует отметить выявление мезенхимальных стволовых клеток. Популяция клеток с фенотипом CD34-45-11b-14-45+144+105+90+73+, характерным для МСК была обнаружена на 10-14 дни послеоперационного периода. Сравнительный анализ концентраций провоспалительных цитокинов, молекул адгезии и факторов роста выявил развитие цитокиновой реакции в периферическом русле преимущественно на 10-14 дни после операции. Выявлено повышение Е-селектина, ICAM, VCAM, свидетельствующих об эндотелиальной активации, VEGF, эритропоэтина, обладающих противовоспалительным, ангиогенным и антиапоптотическим действиями.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время отсутствие эффективных способов замены мультифокального или протяженного пораженного участка трахеи вынуждает исследователей и врачей обратить внимание на использование тканеинженерных подходов для создания биоимплантов трахеи (Барановский Д.С. и др., 2015; Киселевский М.В. и др., 2016).

Исследования в области тканевой инженерии трахеи сфокусированы на разработку ТИК, состоящих из каркасов, заселенных жизнеспособными клетками. Такие конструкции максимально приближены по организации к нативной ткани и помогают организму восстанавливать его структуру в месте повреждения (Crowley C.J. et al., 2015; Hertegard S., 2016; Sheikh F.A et al., 2016).

При создании тканеинженерной конструкции необходимо решать несколько важных проблем: во-первых, ее взаимодействие с клетками и организмом, во-вторых, ответная реакция со стороны биологических объектов как на микро-, так и на макроуровне. Кроме того, всегда возникает вопрос необходимо ли организму помогать принять новый орган или ткань, и нуждается ли он в дополнительной стимуляции. В естественных условиях взаимодействие между внеклеточным матриксом и клетками является двунаправленным. С одной стороны, внеклеточный матрикс контролирует клеточные функции, с другой стороны, клетки регулируют его формирование. Кроме того, строение и конкретные функции варьируют и определяются самой тканью (например, соединительная ткань отличается от эпителиальной).

В контексте взаимодействия клетка - внеклеточный матрикс, основными аспектами, которые требуют рассмотрения при разработке тканеинженерной конструкции, являются определение жизнеспособности и необходимых функциональных свойств клеток в составе тканеинженерной конструкции: адгезии и миграции клеток во внутрь матрикса, пролиферации и дифференцировки в тканеспецифичные типы клеток, соответственно назначению разрабатываемой конструкции (Севастьянов В.И. 2014, Chiang T. et al. 2016).

Идеальный каркас должен обладать рядом свойств, среди которых: обеспечивать жизнедеятельность клеток, иметь взаимосвязанную пористую сеть, как для роста засеянных клеток, так и для миграции клеток из окружающих тканей, васкуляризации и доставки питательных веществ, выполнять функции естественного внеклеточного матрикса (Atala A. et al., 2008; Севастьянов В.И., 2014).

Однако, до сих пор критерии оценки каркасов для ТИК не стандартизированы. Но большинство исследователей в этой области считают биосовместимость каркасов с клетками одним из важных требований, определяющих дальнейшую судьбу использования ТИК (Marahaini M. et al., 2013; Crowley C.J. et al., 2015; Wormald J.C. et al., 2015). Необходимо понимать не только как клетки реагируют на новые условия, в которых они оказались при заселении на каркас, но и какая реакция в целом происходит со стороны организма (на тканевом и системном уровнях) (O'Brien F.J., 2011; Чехонин В.П. и др., 2012).

Для получения каркасов изучают материалы как натурального, так и синтетического происхождения (O'Brien F.J., 2011; Crowley C.J. et al., 2015; Wormald J.C. et al., 2015). Благодаря развитию методов получения полимерных материалов, в частности, технологии электроспиннинга, стало возможным изготовить каркасы из материалов, по физико-химическим свойствам приближающиеся к природным матриксам тканей и органов (Rim N.G. et al., 2013; Сытина Е.В., и др., 2014).

Выбор материала для каркаса будущей ткани или органа зависит от механических, функциональных свойств органа. Среди различных синтетических полимеров, ПЭТ, из которого был сделан каркас тканеинженерной конструкции трахеи, разрешен Food and Drug Administration (Управление по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств) для клинического использования, широко применяется в тканевой инженерии (Detta N. et al., 2010; Moreno M.J. et al., 2011), характеризуется медленной скоростью деградации (Chaouch W. et al., 2009; Detta N. et al., 2010), а также возможностью создания биомеханических и структурных свойств, соответствующих нативной ткани.

Изучение свойств полимера ПЭТ, как материала, предназначенного для получения трубчатого каркаса трахеи, активно проводилось в лаборатории ASTREM, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция.

Ajalloueian F. и соавт. (2014) сравнивали 2D-каркасы из ПЭТ и сополимеров ПЭТ и полиуретана как основу для создания каркасов трахеи. После углубленного изучения свойств каркасов было обнаружено, что применение полимера ПЭТ биологически превосходит использование сополимеров из-за большего количества жизнеспособных клеток и большей площади покрытия клетками (Ajalloueian F. et al., 2014).

Gustafsson Y. и соавт. (2012) анализировали биосовместимость разных синтетических 2D-каркасов. При культивировании МСК в планшетах, покрытых полимером ПЭТ, были выявлены здоровые и живые клетки с морфологией, характерной для мезенхимальных стволовых клеток, с отсутствием пикнотических ядер (Gustafsson Y. et al., 2012; Jungebluth P. et al., 2012).

В проведенных исследованиях была показана биологическая совместимость 2D-каркаса из ПЭТ, которую оценивали по способности каркаса поддерживать жизнеспособность клеток, нормальное функционирование клеток и отсутствие цитотоксичности (Gustafsson Y. et al., 2012; Jungebluth P. et al., 2012; Ajalloueian F. et al., 2014).

Анализируя результаты исследований биосовместимости синтетических каркасов, засеянных разными типами клеток, так или иначе приходится сталкиваться с проблемами экстраполяции экспериментальных данных на человека, так как на мелких животных не всегда возможно моделирование патологических процессов вследствие очевидных отличий в видовых, антропометрических и биологических параметрах (Агрба В.З. и др., 2012). Именно ограниченность подобной экстраполяции и объясняет выбор приматов как модели близкой в филогенезе к человеку для проведения исследований биологических свойств полученных ТИК трахеи.

Предваряя испытания ТИК трахеи на приматах были проведены исследования, подтверждающие отсутствие цитотоксичности используемого

каркаса для трахеи, сохранение функциональной активности клеток, что позволило сделать вывод о биосовместимости каркаса на клеточном уровне.

Гистологический и иммуногистохимический анализ гетеротопических имплантатов дополнил представление о биосовместимости тканеинженерной конструкции на тканевом уровне. Наличие тонкой соединительнотканной капсулы без выраженного фиброза, отсутствие признаков нарушения микроциркуляции, иммунных нарушений свидетельствуют о биосовместимости, отсутствии токсичности тканеинженерной конструкции, что соответствует описанным в литературе реакциям на биосовместимые полимерные материалы (Бухарова Т.Б. и др., 2013; Севастьянов В.И., 2014).

Непосредственно само оперативное вмешательство не отразилось негативно на самочувствии животных. Обезьяны оставались здоровыми, активными, без признаков осложнений. При изучении аутопсийного материала было выявлено, что ТИК сохраняет свои механические свойства, заселена клетками, среди которых обнаруживаются как клетки эпителиальной природы, так и мезенхимального происхождения. Таким образом, полученные результаты исследования биологических свойств тканеинженерных конструкций трахеи в эксперименте *in vivo* на модели павиана вида *Papio hamadryas* дают основания сделать выводы, что ТИК трахеи биологически совместима с аллогенными МСК павиана и не вызывает реакцию тканевого отторжения.

Представляется необходимым отметить положительный факт сохранения активности животных после ортотопической имплантации, результаты изучения биологических свойств ТИК.

В клинической части работы исследованы аутологичные МНК, выделенные из костного мозга пациента. Использование МНК клинически оправдано, поскольку никаких серьезных побочных эффектов при их использовании зарегистрировано не было, а процедура получения фракции МНК из костного мозга доступна и легко выполняема (Guo X. et al., 2012; Mildner M. et al., 2013). Кроме того, использование аутологичной фракции исключало развитие реакции иммунологической несовместимости и передачу гемотрансмиссивных инфекций.

Для получения тканеинженерной конструкции с достаточным количеством клеток требовалось определить количество и жизнеспособность МНК во фракции, выделенной из костного мозга. Малое количество засеянных клеток или их низкая жизнеспособность могли препятствовать в дальнейшем адгезии и пролиферации клеток на каркасе, что естественно отражается на свойствах графта (Zhang F., 2015; Chiang T. et al., 2016).

Ajallouei F. и соавт. (2014) в результате проведенных исследований 2D и 3D-каркасов установили, что минимальное содержание МНК, необходимое для засеивания синтетического каркаса трахеи, составляет не менее 60 млн. клеток в полученной фракции для взрослого пациента. Определение жизнеспособности клеток во фракции по окраске трипановым синим, являлось важным этапом, что позволяло в короткий срок определить количество живых клеток, и при необходимости повторить процедуру забора костного мозга. Во всех случаях было получено достаточное количество жизнеспособных моноклеарных клеток.

Моноклеарные клетки, выделенные из костного мозга, содержат как CD34⁺-гемопозитические, так и CD34⁺-мезенхимальные стволовые клетки (Cao F. et al., 2009). Иммунофенотипирование костного мозга, проведенное перед началом засеивания клетками синтетического каркаса трахеи, выявило только популяцию гемопозитических стволовых клеток. CD34⁺-мезенхимальные стволовые клетки обнаружены не были, что связано с малым их содержанием в костном мозге. По данным литературы содержание МСК составляет 1:10000 – 1:100000 моноклеарных клеток костного мозга. Это значительно ниже, чем количество CD34⁺ гемопозитических стволовых клеток, которые составляют около 1% МНК костного мозга (Jones E., McGonagle D, 2008). По другим данным, содержание МСК в среднем составляет 2-5 клеток на 1000000 МНК костномозгового трансплантата (Хлусов И.А. и др., 2010). В любом случае, в норме выявить популяцию этих клеток с помощью проточной цитометрии крайне затруднительно.

Для культивирования экспериментальной ТИК трахеи и ТИКСинКарНМККМ в биореакторе было выбрано время 72 часа, по истечению которого проводился ряд исследований, позволяющих судить о готовности

тканеинженерных конструкций к имплантациям. Данное время было определено исходя из принципов культивирования мезенхимальных стволовых клеток, так как известно, что в течение 72 часов клетки прикрепляются к пластику (Wobus A.M, Boheler K.R., 2006). Учитывая довольно большие размеры конструкции, большое количество питательной среды (200 мл в одном биореакторе), возникли опасения контаминации ТИК, поэтому решено было не культивировать длительное время. В случае отрицательных результатов изучения жизнеспособности клеток ТИК трахеи в биореакторе, исследования по коррекции времени культивирования были бы продолжены.

Жизнеспособность моноклеарных клеток на синтетическом каркасе трахеи анализировали через 72 часа культивирования в биореакторе непосредственно перед трансплантацией. Необходимо было удостовериться, что клетки на каркасе сохранены, метаболически и функционально активны, продолжают пролиферировать. Выявление жизнеспособных клеток на каркасе являлось важным доказательством того, что тканеинженерная конструкция пригодна к имплантации. Клетки, засеянные на каркас, могут погибнуть, и соответственно, нельзя будет использовать такую конструкцию. Учитывая, что оптимально оценить жизнеспособность клеток возможно только в конце процесса культивирования тканеинженерной конструкции, необходимо было выбрать такие методы исследования, выполнение которых занимало относительно короткий промежуток времени, требовало небольшой участок графта для эксперимента, а получаемые результаты были достоверными и позволяли судить о биосовместимости. Поэтому были использованы 2 метода, МТТ-тест и дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток.

МТТ-тест имеет широкое применение, зарекомендовал себя как надежный, достоверный метод, который позволяет определить, как жизнеспособность культивируемых клеток, так и цитотоксичность материала, в том числе и на различных каркасах.

Впервые колориметрический анализ МТТ был описан в 1983 г. и основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы

МТТ-реagenta до голубого кристаллического формазана, растворимого в диметилсульфоксиде (Mosmann T., 1983). Полученное изменение цвета обнаруживается с помощью спектрофотометра путем измерения абсорбции, которая коррелирует с жизнеспособностью, пролиферацией и числом клеток (Черепович В.С. и др., 2006).

МТТ-тест проводили по модифицированному протоколу Jungebluth P. и соавт. (2012), где было показано, что уменьшение времени инкубации с МТТ-реагентом до 1 часа не влияет на результаты. Авторы утверждают, что на качество анализа влияет плотность засеянных клеток. Чем больше их число, тем реакция более качественна.

Результаты МТТ-теста с образцами до имплантации ТИКСинКарНМККМ подтвердили, что клетки, засеянные на синтетический каркас, жизнеспособны. Примечательно было то, что образцы графта, которые были отсечены во время его имплантации *in situ*, показали наличие неизмененных жизнеспособных и метаболически активных клеток. Полученные данные позволили предположить, что во время операции окружающая среда оказывает минимальное негативное воздействие на клетки тканеинженерной конструкции. К негативным факторам возможно отнести открытое операционное поле, воздух в операционной комнате, температуру окружающей среды.

Дифференциальное окрашивание живых и погибших клеток, использованное для визуальной оценки клеток, позволило нам подтвердить результаты МТТ-теста с помощью прижизненной флуоресцентной микроскопии.

Этот экспресс-тест основан на измерении параметров жизнеспособности клеток: внутриклеточной эстеразной активности и целостности плазматической мембраны. Живые клетки, обладающие внутриклеточной эстеразной активностью, превращают не флуоресцирующий кальцеин АМ, проникающий в живую клетку в кальцеин, интенсивно флуоресцирующий зеленым цветом. В отличие от этого красителя, гомодимер этидия проникает только в клетки с поврежденными мембранами, связывается с нуклеиновыми кислотами, что приводит, таким

образом, к ярко-красной флуоресценции в мертвых клетках. С помощью этого метода было визуализировано большинство живых клеток на каркасе.

Таким образом, данные полученные с помощью двух вышеперечисленных методов дают представление о жизнеспособности клеток на каркасе и свидетельствуют о биосовместимости каркаса с клетками. Немаловажным явилось то, что за короткий промежуток времени была получена достоверная информация о пригодности тканеинженерной конструкции к имплантации.

При качественной оценке тканеинженерной конструкции большое внимание уделяется способности клеток прикрепляться к каркасу, проникать во внутрь 3D-каркаса, пролиферировать и дифференцироваться в тканеспецифичные клетки *in vivo* (O'Brien F.J., 2011).

Гистологический анализ образцов ТИК СинКарНМККМ показал способность клеток к адгезии на синтетическом каркасе и их миграцию во внутрь конструкции. Преимущественная локализация клеток имела место по краям образцов. Данное явление объясняется тем, что тканеинженерная конструкция представляет собой 3D-структуру, и засеянные клетки стремятся туда, где больше содержится питательных веществ и кислорода, в данном случае, их содержание было больше снаружи. Иммуногистохимическое исследование, проведенное с целью определения влияния каркаса на пролиферативную активность клеток, показало, что обнаруженные клетки способны к активной пролиферации. Этот факт в свою очередь подтверждается позитивной реакцией с антителами к маркеру пролиферации – Ki-67.

Цитологическое исследование образцов смывов из бронхоальвеолярного лаважа выявило, что в месте графта происходит смена клеток от недифференцированных до дифференцированных клеток реснитчатого эпителия. В раннем послеоперационном периоде были выявлены мезенхимальные стволовые клетки, а в последующий период наблюдения обнаруживались разные типы эпителиальных клеток. Однако установить природу происхождения мезенхимальных стволовых клеток на каркасе было невозможно. Этими стволовыми клетками могли быть засеянные клетки или мобилизованные из

костного мозга эндогенные стволовые клетки, или локально активированные стволовые клетки. На наш взгляд, это не снижает ценности полученных результатов и подтверждает биологическую совместимость клеток с каркасом, а также сохранение их жизнедеятельности после трансплантации *in situ*.

На основании полученных результатов можно утверждать, что синтетический каркас создает необходимое микроокружение для жизнедеятельности клеток как *in vitro* в биореакторе, так и в организме реципиента. Это подтверждается тем, что клетки продолжали пролиферировать, расти и дифференцироваться на каркасе после имплантации.

В процессе развития регенеративной медицины выяснилось, что эффективность тканеинженерных конструкций требует создания адекватного для используемых клеток микроокружения, к которому относят, помимо каркаса, имитирующий естественный внеклеточный матрикс, биологические активные молекулы, обеспечивающие взаимодействие между клетками и каркасом, а также клеток друг с другом (Пинаев Г.П., Богданова М.С., 2008).

Помимо влияния внешних факторов на получение тканеинженерного органа рассматриваются возможности собственного организма, который может играть роль биореактора, создавая микроокружение для формирования тканеинженерной конструкции *in situ* (Севастьянов В.И., 2014).

Представление о том, что организм возможно использовать как биореактор для развития органа, рассматривается как многообещающее направление регенеративной медицины. Предполагается, что такой подход будет способствовать сокращению времени для создания тканеинженерной конструкции, уменьшению риска контаминации, снижению финансовых затрат.

Jungebluth P. и соавт. (2012) считают, что концепция развития тканеинженерной конструкции *in vivo* на модели животных (свиньи) позволяет значительно сократить время от начала процесса засеивания децеллюляризированного матрикса до его имплантации ($7 \pm 1,8$ против 852 ± 16 ч).

Одним из ключевых моментов после трансплантации тканеинженерного органа является активация механизмов регенерации, интеграции тканеинженерной конструкции с окружающими тканями.

На данный момент остается открытым вопрос: если мезенхимальные стволовые клетки играют роль в тканевом заживлении, то это происходит за счет их активации локально в месте повреждения или за счет выброса в периферическую кровь из ниш, например, костного мозга (Kausser K., 2007; Jungebluth P. et al., 2011).

Молекулярные механизмы, которые контролируют мобилизацию стволовых клеток из костного мозга в настоящее время интенсивно исследуются. Тем не менее, активная мобилизация стволовых клеток, с помощью, например, специфических факторов, рассматривается как один из возможных подходов к улучшению регенерации ткани (Chistiakov D.A., 2010; Jungebluth P. et al., 2011).

В нашем исследовании пациенты получали стимулирующую терапию препаратами Г-КСФ и эритропоэтином. Г-КСФ и эритропоэтин являются сильными активаторами увеличения пула стволовых клеток и стимуляторами раневого заживления (Jungebluth P. et al., 2012). Для стимулирующей терапии было определено время введения препаратов в течение 14 суток, в ранний послеоперационный период, когда возникает риск развития раннего отторжения. Другим аспектом использования стимулирующей терапии служило то, что стволовые клетки обладают хоминг-эффектом, трофическим и протекторным действием на тканевые и клеточные флуктуации в месте повреждения (Шахпазян Н.К. и др., 2012; Vieback K. et al., 2012), и для их эффективной мобилизации необходимы дополнительные условия.

В литературе имеются противоречивые результаты о мобилизации мезенхимальных стволовых клеток под действием Г-КСФ. По данным одних авторов Г-КСФ обладает способностью мобилизовать стволовые клетки, как гемопоэтические, так и мезенхимальные, из костного мозга (Коненков В.И. и др., 2011; Guo X. et al., 2012). Другие исследования указывают, что Г-КСФ не вызывает мобилизацию мезенхимальных стволовых клеток, а стимулирует их пролиферацию

в костном мозге опосредованно за счет резорбции остеокластами (Brouard N. et al., 2010; Rankin S.M., 2012; Ray S. et al., 2013).

Одним из предположительных механизмов мобилизации МСК под действием Г-КСФ, считается утрата межклеточных контактов в микроокружении с другими типами клеток (макрофагами, фибробластами, эндотелиоцитами, адипоцитами и другими) в костном мозге (Zhdanov V.V. et.al., 2007; Ray S. et.al., 2013).

Другое предположение основано на том, что их количество в периферической крови может коррелировать со степенью мобилизации Г-КСФ, а не на его введение (Kauser K., 2007).

Использование эритропоэтина в регенеративной медицине основано на локальных эффектах, которые он оказывает в месте повреждения ткани и гипоксии, а именно, антиапоптотическое действие, стимуляция ангиогенеза, а также антагонизм с TNF- α (Bader A., Machens H.G., 2010; Brines M., 2010; Jungebluth P. et al., 2012; Chekhonin V.P. et al., 2013). Использование препарата эритропоэтина с целью оказания локального действия в месте повреждения описано и в других работах (Bader A., Machens H.G., 2010). Эритропоэтин необходимо вводить в высокой дозе для связывания с бета-изоформой ЭПО-рецептора, что приводит к активизации антиапоптотических генов и предупреждает гибель клеток (Brines M., 2010, Jungebluth P. et al., 2012; Sorg H. et al., 2013). Для предотвращения гибели клеток и во избежание недостатка локальной продукции эритропоэтина вводился его рекомбинантный аналог в дозе ≥ 500 МЕ/кг. Несмотря на полезное свойство эритропоэтина - тканевую протекцию, применение высоких доз может иметь негативный характер из-за активации эритропоэза, развития эритроцитоза, усиления прокоагулянтного эффекта и нарушений гемодинамики.

На фоне приема Г-КСФ и эритропоэтина у пациентов были выявлены изменения клеточного состава периферической крови. На всем протяжении терапии у пациентов наблюдался лейкоцитоз, но он не превышал пороговых значений (более $50-60 \times 10^9/\text{л}$). Лейкоцитоз, а также небольшой тромбоцитоз, тоже следствие стимуляции костного мозга.

Увеличение популяции гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови происходило сразу после применения препаратов. В отличие от этого МСК появлялись в кровотоке в среднем на 4-е сутки после операции. В последующем их определяли на протяжении всего периода терапии. Максимальное содержание МСК отмечено на 10-12 сутки. Популяцию мезенхимальных стволовых клеток в периферической крови идентифицировали по наличию фенотипа, определяемого с помощью проточной цитометрии. Установленный фенотип являлся одной из характеристик МСК и был обозначен Международным обществом по клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy) в году 2006 г. (Dominici M. et al., 2006; Sharma R.R. et al., 2014). Известно, что эти клетки не экспрессируют CD34 (маркер примитивных (ранних) гемопоэтических клеток), CD11b (маркер клеток миелопоэза), CD14 (рецептор липополисахаридов), CD45 (маркер лейкоцитов). К позитивным и наиболее специфичным маркерам мезенхимальных стволовых клеток относят CD73, CD105 (эндоглин, рецептор TGF β III, у МСК играет преимущественно сигнальную роль в процессах хондрогенной дифференцировки и участвует во взаимодействии стволовых клеток (гемопоэтических и мезенхимальных) в костном мозге), CD90 (Thy-1, дифференцировочный антиген Т-лимфоцитов).

По данным ряда авторов, в периферической крови обнаруживается очень малая популяция клеток, несущих фенотипические и морфологические характеристики МСК (Zvaifler N. et al., 2000; Хлусов И.А. и др., 2010; Wei A. et al., 2014). Поэтому выявление популяции мезенхимальных стромальных клеток в периферической крови может быть результатом проводимой терапии.

С другой стороны, вполне вероятно предположить, что воспаление и гипоксия (Rochefort G.Y. et al., 2006; Okumura T. et al., 2009; Kolonin M.G. et al., 2012), вызванные хирургической манипуляцией, выброс хемокинов и анафилатоксинов в месте имплантации, могли быть причиной наблюдаемой мобилизации МСК у пациентов.

Известно, что мезенхимальные стволовые клетки способствуют регенерации тканей: костной, хрящевой, мышечной, а также восстановлению сосудов

(Матюков А.А. и др., 2007; Давыденко В.В. и др., 2007; Деев Р.В. и др., 2007; Rastegar F. et al., 2010; Richardson S.M. et al., 2016; Yan B. et al., 2017).

Во многих работах показано, что участие МСК в восстановлении тканей *in vivo* обусловлено тропизмом данных клеток к месту повреждения (Spaeth E. et al., 2008; Schraufstatter I.U. et al., 2009; Yagi H. et al., 2010; Moll G. et al., 2011; Шахпазян Н.К. и др., 2012;). Стволовые клетки затем могут дифференцироваться в тканеспецифичные клетки (Spees J.L. et al., 2003). В самом месте повреждения МСК создают специфическое микроокружение за счет продукции широкого спектра противовоспалительных, провосстановительных и проангиогенных факторов (Park K.S. et al., 2010; Caplan A.I., Correa D., 2011; Bieback K. et al., 2012, Huang Y.C. et al., 2013), оказывают протекторное и трофическое действие на другие клетки путем гуморального и контактного взаимодействия с ними (Spees J.L. et al., 2003; Шахпазян Н.К. и др., 2012; Richardson S.M. et al., 2016). Вещества, выделенные из МСК, ингибируют апоптоз (Шахпазян Н.К. и др., 2012; Perl L. et al., 2010; Murphy M.B. et al., 2013) и могут вызвать мобилизацию эндогенных стволовых или прогениторных клеток (Bonfield T.L. et al., 2010; Bieback K. et al., 2012; Jacobs S. et al., 2013; Richardson S.M. et al., 2016).

Известно, что стволовые клетки содержатся не только в костном мозге, но и в определенных нишах разных органов (в мозге, эпидермисе, легком, верхних дыхательных путях, в мышцах и т.д.), участвуя в процессах регенерации и репарации. Число этих клеток не велико, и обычно в организме они находятся в состоянии покоя, активизируясь лишь при определенных условиях, например, при повреждении органа (Weiss D.J., 2013).

Обнаруженная популяция МСК в периферической крови свидетельствует об их мобилизации. В цитологических образцах смывов бронхоальвеолярного лаважа так же были выявлены мезенхимальные стволовые клетки. Однако происхождение этих клеток установить было невозможно.

Интересно отметить тот факт, что время появления популяции МСК соответствовало максимальному уровню эритропоэтина в крови. Гемопоэтические стволовые клетки, относительное содержание которых в периферической крови

возрастало на фоне проводимой терапии, выявлялись в наибольшем количестве на 8-е сутки.

Возрастание популяции МСК в периферической крови может косвенно свидетельствовать о локальном влиянии этих клеток на процесс регенерации ткани (Bartaula-Brevik S. et al., 2016). В последние годы установлено, что стволовые клетки костного мозга и, в частности, мезенхимальные стволовые клетки, могут создавать микросреду в легочной ткани с помощью паракринных влияний, действуя на различные клеточные структурные компоненты легких (эпителиальные и эндотелиальные клетки, фибробласты) путем выделения провоспалительных и иммуномодулирующих биологически активных веществ (Conese M. et al., 2013).

С другой стороны, сами биологические активные вещества по-разному оказывают влияние на клеточные процессы в зависимости от их принадлежности, в том числе и на МСК, создавая необходимое микроокружение для движения клеток, их пролиферации и дифференцировки (Huang Y.C. et al., 2013). МСК экспрессируют уникальный набор рецепторов к хемокинам, которые, как считается, участвуют в хоминг-эффекте этих клеток. На экспериментальной модели повреждения легких, индуцированном облучением и введением эластазы, было показано наличие хоминга мезенхимальных стволовых клеток в легочную ткань. Предполагается, что локальная продукция хоминг-факторов в легких способствует привлечению клеток из костного мозга в поврежденную легочную ткань, что оказывает влияние на течение воспалительной реакции (Denburg J.A., van Eeden S.F., 2006, Mueller M. et al., 2016).

Изменение содержания биологически активных веществ в разные дни наблюдения были выявлены у пациентов после трансплантации ТИКСинКарНМККМ. Отмеченное в начальном периоде после операции повышение уровня $\text{TNF-}\alpha$, IL-2, VCAM, вероятно, связано с повреждением и воспалением, вызванными самой операцией. В то же время, ранее возрастание содержания провоспалительных цитокинов, молекул адгезии может быть связано с привлечением клеток в место повреждения. В работе Sohni A. и соавт. (2013) было

продемонстрировано, что TNF- α , IL-1 усиливают миграцию МСК, вызывая их хоминг через активацию матриксной металлопротеиназы. Кроме того, лейкоцитоз, индуцированный Г-КСФ, и выброс протеаз могут также способствовать мобилизации стволовых клеток. Выброс прогениторных клеток предположительно происходит путем ослабления связей внутри ниши, либо деградацией связи с компонентами внеклеточного матрикса или с хемокином CXCL12.

Обнаружение обратной корреляционной связи между изменениями уровня IL-2 и пулов CD73+CD90+CD105+- позитивных клеток можно интерпретировать как иммуномодулирующий эффект мезенхимальных стволовых клеток (Murphy M.B. et al., 2013; Ben-Ami E. et al., 2014; Niu P. et al., 2015).

Новые данные исследований аутоиммунных нарушений и моделей опухолевого процесса указывают на то, что иммуномодулирующие свойства взрослых мезенхимальных стволовых клеток могут быть обусловлены восприимчивостью клеток к присутствию IL-2 в воспалительной среде (Ben-Ami E. et al., 2014). Кроме того, сами МСК могут продуцировать терапевтические цитокины, такие как интерферон- β и IL-2 (Niu P. et al., 2015), чтобы обеспечить благоприятный противоопухолевый эффект.

По литературным данным, секреция широкого спектра факторов роста и противовоспалительных белков МСК может модулироваться в ответ на воспалительные молекулы, не только на IL-2, но и другие, такие как IL-1, TNF- α и интерферон- γ , тем самым обеспечивая комплексную сигнализацию для многих воспалительных клеток, включая Т-клетки, натуральные киллеры, В-клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки (Ichim T.E. et al., 2010; Murphy M.B. et al., 2013; Ben-Ami E. et al., 2014). Сообщается, что провоспалительные цитокины способны увеличить миграцию МСК человека, индуцировать продукцию хемокинов и хемотаксических факторов, которые позволяют МСК подавлять иммунные реакции (Ben-Ami E. et al., 2014). Тем не менее, механизмы воздействия на иммунный ответ МСК до конца остаются не раскрытыми. Поэтому, основываясь на данных литературы, следует предположить, что происходит комплексное взаимовлияние провоспалительных цитокинов и МСК друг на друга.

Отмеченное повышение концентрации VCAM в раннем послеоперационном периоде может свидетельствовать об адгезии МСК к эндотелиальным клеткам, так как интегриновые лиганды VCAM и ICAM экспрессируются на мезенхимальных стволовых клетках (Sohni A., Verfaillie C.M., 2013). Melchiorri A.J. и соавт. (2014) показали, что МСК прикрепляются к эндотелиальным клеткам через VCAM-1, а TNF- α индуцирует их адгезию к эндотелиоцитам.

В исследовании Jungebluth P. и соавт. (2011) также было обнаружено выделение большого количества растворимых медиаторов при заживлении ран, которые могли бы стимулировать мобилизацию МСК. Это было описано ранее другими исследователями (Denburg J.A., van Eeden S.F., 2006; Kolonin M.G. et al., 2012).

Наблюдаемое повышение уровня факторов заживления (эритропоэтина, VEGF) с максимумом на 10-14 день сопровождалось повышением содержания IL-1, IL-2, TNF- α , VCAM, ICAM, Е-селектина. Обнаруженное увеличение уровня TNF- α , VEGF свидетельствует в пользу активации процесса неоангиогенеза. Известно, что TNF- α является не только провоспалительным цитокином, но и служит показателем ранней васкуляризации (Melchiorri A.J. et al., 2014).

В работе Shi Z. и соавт. (2014) исследовалась экспрессия разных маркеров и факторов мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани и обработанных эпигенетическим препаратом, и была установлена значительная экспрессия биологически активных веществ, ассоциированных с эндотелиальными клетками и образованием сосудов. Была выявлена экспрессия VCAM-1, VEGF-2, молекулы клеточной адгезии тромбоцитов/эндотелиоцитов (PECAM-1), фактора фон Виллебранда, тромбоцитарного фактора роста и других веществ. Jungebluth P. и соавт. (2011) сообщают о повышении содержания молекул эндотелиальной активации: Е-селектина, VCAM-1 и ICAM-1. Наличие положительной связи между молекулами ICAM и Е-селектина, между популяциями CD34⁺-клеток, МНК и молекулой ICAM может также подтверждать эндотелиальную активацию.

Интересно отметить тот факт, что повышение уровня проангиогенных противовоспалительных факторов совпало по времени с возрастанием популяции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в периферической крови.

Из всего вышеописанного можно сделать заключение, что в месте имплантации тканеинженерной трахеи происходит активация процессов регенерации. Этому также способствуют мобилизованные МСК из костного мозга, активацию и выброс которых усиливает стимулирующая терапия.

Таким образом, проведенные исследования доказали наличие функциональной активности ТИКСинКарНМККМ, которая способствует сохранению морфофункциональных свойств МНК и дифференцировки клеток *in vivo*, и не оказывает цитотоксического эффекта. Принимая во внимание результаты изучения хоминг-эффектов стволовых клеток, исследования трофического и протекторного их действия на тканевые и клеточные флуктуации в месте повреждения (Шахпазян Н.К. и др., 2012; Vieback K. et al., 2012) есть все основания полагать, что стимулирующая терапия Г-КСФ и эритропоэтином в раннем послеоперационном периоде является необходимым этапом тканеинженерного подхода при терапии пациентов с заболеваниями, требующими приживления, адаптации тканеинженерных конструкций и регенерации тканей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложенный тканеинженерный подход в лечении мультифокальных и протяженных стенозов трахеи включает использование тканеинженерной конструкции и проведение дополнительной фармакологической терапии.

Экспериментальное исследование результатов применения тканеинженерной конструкции трахеи подтвердило отсутствие цитотоксичности используемого каркаса для трахеи, сохранение функциональной активности клеток, что позволило сделать вывод о биосовместимости каркаса на клеточном уровне. Выбранный период культивирования тканеинженерной трахеи в течение трех суток был достаточен для прикрепления и адаптации клеток к новым условиям *in vitro*. Гистологический и иммуногистохимический анализ гетеротопических имплантатов дополнил представление о биосовместимости тканеинженерной конструкции на тканевом уровне. При изучении аутопсийного материала было выявлено, что тканеинженерная конструкция сохраняет свои механические свойства, заселена клетками, среди которых обнаруживаются как клетки эпителиальной природы, так и мезенхимального происхождения.

Проведенные клинические исследования доказали наличие функциональной активности тканеинженерной конструкции трахеи, которая способствует сохранению морфофункциональных свойств моноклеарных клеток костного мозга и дифференцировки клеток *in vivo*, и не оказывает цитотоксического эффекта. Принимая во внимание результаты изучения хоминг-эффектов стволовых клеток, исследования трофического и протекторного их действия на тканевые и клеточные флуктуации в месте повреждения (Шахпазян Н. К. и др., 2012; Vieback K. et al., 2012) есть все основания полагать, что стимулирующая терапия гранулоцитарным колониестимулирующим фактором и эритропоэтином в раннем послеоперационном периоде является необходимым этапом тканеинженерного подхода при терапии пациентов с заболеваниями, требующими приживления, адаптации тканеинженерных конструкций и регенерации тканей.

Отличительной чертой представленного тканеинженерного подхода в лечении стенозов трахеи является возможность использования самого организма человека в качестве биореактора, когда используется стимулирующая терапия, что позволяет улучшить технологию получения тканеинженерного органа и уменьшить риск нежелательных осложнений.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Учитывая в настоящее время активное развитие технологий регенеративной медицины, при этом отсутствие единых критериев оценки создаваемых тканеинженерных конструкций, представляется перспективным разработка алгоритмов и рекомендаций по изучению свойств и характеристик биоинженерных конструкций. Дальнейшее продолжение исследований необходимо проводить с акцентом на изучение адаптации каркасов в организме, что позволит максимально использовать возможности собственного организма как биореактора.

ВЫВОДЫ

1. Комплексный анализ параметров биологической совместимости тканеинженерной конструкции трахеи с аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками приматов вида *Papio hamadryas*, а также результаты ее гетеротопической и ортотопической имплантаций в экспериментах *in vivo* не выявили цитотоксического действия и признаков реакции тканевого отторжения имплантата.

2. Анализ результатов хирургического лечения пациентов со стенозами трахеи выявил наиболее сложную категорию больных, хирургическое лечение которых существующими методами, такими как циркулярная резекция, эндоскопические манипуляции, было неэффективно, на основании чего определены критерии отбора пациентов для включения в протокол клинического исследования «Трансплантация тканеинженерной трахеи». В протокол клинического исследования необходимо включать пациентов с прогрессирующим

мультифокальным и протяженным рубцовым стенозом трахеи более 50% длины, которым невозможно провести никакие другие виды хирургического лечения.

3. Морфофункциональный анализ аутологичных моноклеарных клеток костного мозга, засеянных на полиэтилентерефталатный каркас, показал их способность к адгезии, выживаемость по результатам МТТ теста, и экспрессию маркера пролиферации клеток Ki-67 (пролиферативный индекс составил $40 \pm 2,5\%$).

4. Проточный иммуноцитофлюориметрический анализ гемопоэтических стволовых клеток и мезенхимальных стволовых клеток в периферической крови выявил эффект их мобилизации и стимуляции под действием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста и эритропоэтина. Выявлена прямая пропорциональная связь между повышением популяции CD34⁺-клеток и увеличением количества моноклеарных клеток ($r = 0,7834$, $p < 0,05$). Количественные изменения популяций CD73⁺-, CD105⁺-, CD90⁺-клеток находились в тесной положительной корреляционной связи друг с другом (CD73 – CD90: $r = 0,8486$, $p < 0,05$, для пары CD105 – CD90: $r = 0,9877$, $p = 0,0016$).

5. Сравнительный количественный иммуноферментный анализ провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-1, интерлейкина-2), факторов роста (эритропоэтина, фактора роста эндотелия сосудов), молекул адгезии (Е-селектина, молекул межклеточной адгезии 1 типа, молекул адгезии сосудистого эндотелия 1 типа) в сыворотке крови пациентов с имплантированной тканеинженерной конструкцией трахеи выявил достоверный эффект активации их биосинтеза в раннем послеоперационном периоде. Положительная корреляционная связь между увеличением концентрации ICAM и повышением уровня Е-селектина ($r = 0,7298$, $p < 0,05$) косвенно свидетельствует об активации эндотелиоцитов, а обратная пропорциональная зависимость между увеличением концентрации IL-2 и уровнем популяции МСК (IL-2 – CD90: $r = -0,9370$, $p < 0,05$; IL-2 – CD73: $r = -0,8538$, $p < 0,05$; IL-2 – CD105: $r = -0,9767$, $p < 0,001$) указывает на иммуномодулирующий эффект мезенхимальных стволовых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агапова, О.И. Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка для регенеративной медицины / О.И. Агапова, А.Е. Ефимов, М.М. Мойсенович [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. 17. – № 2. – С. 37-44.
2. Агрба, В.З. Возможные аспекты использования культур стволовых клеток лабораторных приматов в экспериментальной медицине / В.З. Агрба, В.А. Порханов, А.Г. Конопляников [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 3. – С. 139-142.
3. Алексеев, А.В. Сравнение эффективности современных респираторных технологий на основных этапах операции двухуровневой резекции и реконструкции трахеи (клиническое наблюдение) / А.В. Алексеев, М.А. Выжигина, В.А. Титов [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2014. – № 1. – С. 68-70.
4. Барановский, Д.С., Получение функционально-полноценного мерцательного эпителия *in vitro* для тканевой инженерии трахеи / Д.С. Барановский, А.В. Люндуп, В.Д. Паршин // Вестник РАМН. – 2015. – Т. 70. – № 5. – С.561-567.
5. Брюсов, П.Г. Современные аспекты неотложной торакальной хирургии в ГВКГ им. Н.Н. Бурденко / П.Г. Брюсов // Военно-медицинский журнал. – 2006. – Т. 327. – № 5. – С. 13-18.
6. Бухарова, Т.Б. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля / Т.Б. Бухарова, А.В. Волков, Е.Н. Антонов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. – Т. VIII. – № 4. – С. 61-68.
7. Волова, Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов // [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие– Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

8. Воротников, А.В. Направленная миграция и мезенхимальные прогениторные клетки: участие в воспалении, репарации и регенерации ткани / А.В. Воротников, Ю.Г. Суздальцева, Ю.П. Рубцов [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник стат. – 2012. – С. 57-91.
9. Гасанов, А.Л. Эндоскопическая диагностика, лечение и профилактика интубационных повреждений гортани и трахеи у нейрохирургических больных / А.Л. Гасанов, Н.Н. Левицкая, Т.П. Пинчук [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2013. – № 4. – С.63-66.
10. Гольдберг, Е.Д. Механизмы мобилизации мезенхимальных клеток-предшественников гранулоцитарным колониестимулирующим фактором и гиалуронидазой / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, Г.Н. Зюзьков [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144. – № 12. – С. 652-657.
11. Гюсан, С.А. Лечение рубцовых стенозов гортани и трахеи / С.А. Гюсан // Вестник оториноларингологии. – 2010. – № 4. – С. 70-71.
12. Давыденко, В.В. Влияние аутотрансплантации различных клеток костного мозга на морфофункциональное состояние миокарда кролика после инфаркта / В.В. Давыденко, А.Л. Матюков, Н.В. Цупкина [и др.] // Гены и клетки. – 2007. – Т. 2. – № 2. – С. 52-61.
13. Деев, Р.В. Использование стромальных клеток костного мозга, мобилизованных на гранулах биоситалла, для пластики костей мозгового черепа / Р.В. Деев, Н.В. Цупкина, Н.С. Николаенко [и др.] // Гены и клетки. – 2007. – Т. 2. – № 2. – С. 62-67.
14. Дыгай, А.М. Мобилизация прогениторных клеток в кровь с помощью иммобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора / А.М.Дыгай, Г.Н. Зюзьков, В.В. Жданов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. - № 2. – С. 63-66.
15. Кирасирова, Е.А. Лечебный алгоритм при стенозе гортани и шейного отдела трахеи различной этиологии / Е.А. Кирасирова, Ф.С. Каримова, В.А. Кабанов // Вестник оториноларингологии. – 2006. – № 2. – С. 20-24.

16. Кирсанова, Л.А. и др. Влияние микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогеля на культуры островковых клеток поджелудочной железы / Л.А. Кирсанова, Н.В. Баранова, Г.Н. Бубенцова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI. – № 1. – С. 29-33.
17. Киселевский, М.В. Механические свойства синтетических матриц трахеи на основе полимерного ультраволокнистого материала / М.В. Киселевский, Н.Ю. Анисимова, А.Д. Шепелев [и др.] // Вестник пермского университета. – 2015. – Т. 30 – № 3. – С.12-18.
18. Киселевский, М.В. Биосовместимые синтетические матрицы трахеи на основе полимерных ультраволокнистых материалов, колонизированные мезенхимальными мультипотентными клетками / М.В. Киселевский, Н.Ю. Анисимова, Е.А. Корнюшенков [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8. – № 1. – С. 6-13.
19. Кичигина, О.С. Анализы результатов наложения трахеотрахеальных анастомозов в условиях различного объема резекции / О.С. Кичигина, А.В. Иванов, А.И. Бежин // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 4. – С. 42-45.
20. Козлов, К.К. Экспериментальное обоснование использования гладкого стента с наружновнутренней фиксацией в эндоскопическом лечении рубцовых стенозов трахеи / К.К. Козлов, Е.Ж. Копин, М.С. Коржук [и др.] // Омский научный вестник. – 2011. – Т. 104. – № 1. – С. 20-23.
21. Коненков, В.И. Влияние G-CSF на проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью / В.И. Коненков, О.В. Повещенко, И.И. Ким [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – Москва. – 2011. – Т. VI. – № 3. – С. 71-75.
22. Коркин, Ю. Г. Результаты лечения больных с осложненными формами ИБС методом имплантации моноклеарных клеток костного мозга / Ю.Г. Коркин, Ш.Д. Ахмедов, В.Е. Бабокин // Сборник статей НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН по материалам Десятой ежегодной сессии научного

- центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН с всероссийской конференцией молодых ученых. – Москва. – 2006. – Т. 7. – № 3. – С. 103.
23. Котив, Б.Н. Хирургическая анатомия изменений, вызванных рубцовыми стенозами трахеи / Б.Н. Котив, И.Б. Попов, Л.Н. Бисенков [и др.] // Вестник российской медицинской академии. – 2012. – Т.37. – № 1. – С. 40-43.
 24. Лазаренко, Н.Н. Новые возможности в реабилитации больных с рубцовыми стенозами гортани и трахеи / Н.Н. Лазаренко, А.В. Инкина, М.Ю. Герасименко [и др.] // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация» 2014. – № 3. – С. 23-26.
 25. Марков, В.А. Разработка и внедрение новых методов лечения острого коронарного синдрома / В.А. Марков, И.В. Максимов, В.В. Рябов // Сибирский медицинский журнал. – 2007. – № 3. – С. 10-16.
 26. Матюков, А.Л. Сравнение влияния интрамиокардиальной аутотрансплантации различных клеток костного мозга на репарацию миокарда кроликов после инфаркта / А.Л. Матюков, Н.В. Цупкина, Т.Д. Власов [и др.] // Гены и клетки. – 2007. – Т. 2. – № 1. – С. 48-53.
 27. Мосин, И.В. Комплексное лечение рубцовых стенозов верхней трети трахеи / И.В. Мосин, А.Б. Сангинов, А.А. Бажанов // Хирургия. – 2011. – № 2. – С. 37-39.
 28. Назыров, Ф.Г. Непосредственные и отдаленные результаты стентирования трахеи при рубцовых стенозах / Ф.Г. Назыров, Ш.Н. Худайбергенов, О.Д. Эшонходжаев [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания – 2014. – № 53. – С. 63-69.
 29. Никитина, Э.М. Реконструкция трахеи (обзор проблемы) / Э.М. Никитина, В.А. Соболевский // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2012. – №. 1. – С. 126-136.
 30. Паршин, В.Д. Хирургия трахеи с атласом оперативной хирургии / В.Д. Паршин, В.А. Порханов // М.: Альди-Принт, 2010. – С. 479.
 31. Паршин, В.Д. Этиология, профилактика, лечение протяженных и мультифокальных рубцовых стенозов трахеи на стыке наук хирургии и анестезиологии / В.Д. Паршин, М.А. Выжигина, С.С. Черный [и др.] //

- Анестезиология и реаниматология. – 2011. – № 2. – С.18-23.
32. Паршин, В.Д. Двухуровневая резекция трахеи с анастомозами при мультифокальном рубцовом стенозе / В.Д. Паршин, М.А. Русаков, В.А. Титов [и др.] // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2012. – № 5. – С.82-83.
 33. Перевозникова, И.А. Комплексная лучевая диагностика рубцовых стенозов трахеи / И.А. Перевозникова, А.Р. Козак // Лучевая диагностика и терапия. – 2010. – №3. – С. 33-38.
 34. Пинаев, Г.П. Методы культивирования клеток / Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой // СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – С.278.
 35. Попов, И.Б. Хирургические методы лечения рубцовых стенозов трахеи. Определение показаний и противопоказаний (обзор литературы) / И.Б. Попов, Д.А. Щербаков, К.П. Бухарова // Университетская медицина Урала. – 2016. – Т.2. – №5. – С. 41-47.
 36. Сангинов, А.Б. Хирургическое и комбинированное лечение рубцовых стенозов трахее / А.Б. Сангинов, И.В. Мосин, С.В. Матвеев [и др.] // Вестник Авиценны. – 2010. – №2. – С. 18–25.
 37. Сангинов, А.Б. Хирургическое лечение рубцовых стенозов трахеи и дистального отдела гортани: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17 / Сангинов Абдурасул Бобоевич. – СПб., 2011. – С. 34.
 38. Севастьянов, В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 16. – № 3. – С.93-108.
 39. Севастьянова, В.В. Свойства тканеинженерных матриксов из поликапролактона, импрегнированных факторами роста VEGF и bFGF / В.В. Севастьянова, Y.L. Elgudin, G.E. Wnek [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7. – № 3. – С. 62-67.
 40. Серебренникова, Е.В. Постинтубационные осложнения при длительной искусственной вентиляции легких / Е.В. Серебренникова, А.Г. Короткевич, Е.В. Григорьев [и др.] // Политравма. – 2011. – № 2. – С.48-52.

41. Сытина, Е.В. Сравнительная оценка биосовместимых полимерных матрицков, полученных путем электроформования, и их использование для создания объемных дермальных эквивалентов / Е.В. Сытина, Т.Х. Тенчурин, С.Г. Рудяк [и др.] // Молекулярная медицина. – 2014. – №6. – С. 38-47.
42. Татур, А.А. Радикальное хирургическое лечение рубцовых стенозов трахеи / А.А. Татур, С.И. Леонович // Московский хирургический журнал. – 2011. – Т.17. – №1. – С. 8-12.
43. Татур, А.А. Циркулярная резекция трахеи в лечении ее рубцовых стенозов / А.А. Татур // Медицинский журнал. – 2014. - Т. 47. – № 1 – С.119-124
44. Топольницкий, Е.Б. Новые технологии в реконструктивной хирургии повреждений и рубцовых стенозов трахеи / Е.Б. Топольницкий, А.В. Квасов, Е.И. Беликов [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2012. – Т. 86. – № 4. – С. 112-116.
45. Холоденко, И.В. Молекулярные и клеточные механизмы миграции и хоминга мезенхимальных стволовых клеток, трансплантированных внутривенно / И.В. Холоденко, А.А. Кониева, Р.В. Холоденко [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник стат. – 2014. – С. 196-218.
46. Хлусов, И.А. К вопросу о фибробластоподобных клетках в периферической крови человека / И.А. Хлусов, К.А. Нечаев, Н.М. Шевцова [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т.5. – № 4. – С. 72-78.
47. Чарышкин, А.Л. Результаты хирургического лечения больных с трахеостомами и стенозом трахеи / А.Л. Чарышкин, Н.В. Ванина, Л.М. Лебедева // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2012. – № 3. – С. 75-79.
48. Черепович, В.С. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности / В.С. Черепович, Е.В. Волочник, Е.В. Антоненко [и др.] // Медицинский журнал. – 2006. – № 2. – С. 106-108.
49. Черный, С.С. Реконструктивная хирургия протяженных и мультифокальных рубцовых стенозов трахеи: автореф. дис. ...канд. мед. наук: 14.01.17 / Черный Сергей Семенович. – М., 2011. – С.24.
50. Чехонин, В.П. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза /

- В.П. Чехонин, С.А. Шеин, А.А. Корчагина [и др.] // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2012г. – №2. – С. 23-35.
51. Шахпазян, Н.К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н.К. Шахпазян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – № 1. – С. 23-33.
 52. Яицкий, Н.А. Роль эндоскопических методов в лечении рубцовых стенозов трахеи / Н.А.Яицкий, В.А.Герасин, А.В.Герасин [и др.] // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2012. – Т .171. - № 3. - С.11-15.
 53. Яременко, А.И. Современные остеопластические и остеоиндуктивные материалы. Состояние проблемы. Перспективы применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии / А.И. Яременко, Д.В. Галецкий, В.О. Королёв // Научно-практический журнал Институт Стоматологии. – 2011. – Т.51. – № 2. – С. 70-71.
 54. Ярыгин, К.Н. Регенеративная биология и медицина Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы / под ред. ВН Ярыгина и др. // Москва, Омск, Томск, Ханты-Мансийск: Омская областная типография. – 2015. – С. 360.
 55. Abbasidezfouli, A. Postintubation multisegmental tracheal stenosis: treatment and results / A.Abbasidezfouli, M.J.Shadmer, M.Arab [et al.] // Ann Thorac Surg. – 2007. – № 84. – P. 211-214.
 56. Acocella, F. Prefabricated tracheal prosthesis with partial biodegradable materials: a surgical and tissue engineering evaluation in vivo / F.Acocella, S.Brizzola, C.Valtolina [et al.] // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2007. – Vol. 18. – № 5. – P. 579-594.
 57. Ajalloueian, F. Biomechanical and biocompatibility characteristics of electrospun polymeric tracheal scaffolds / F. Ajalloueian, M.L. Lim, G. Lemon [et al.] // Biomaterials. – 2014. – № 35. – P. 5307-5315.

58. Arcasoy, M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin / M.O. Arcasoy // *Br. J. Haematol.* – 2008. – Vol. 141. – № 1. – P. 14-31.
59. Atala, A. Principles of regenerative medicine / A. Atala, R. Lanza, J.A. Thomson [et al.] // *Burlington: Elsevier Science* – 2008. – P. 1473.
60. Atala, A. Regenerative medicine strategies / A. Atala // *J Pediatr. Surg.* – 2012. – Vol. 47. – № 1. – P. 17-28.
61. Auchincloss, H.G. Complications after tracheal resection and reconstruction: prevention and treatment / H.G.Auchincloss, C.D.Wright // *Journal of thoracic disease.* – 2016. – Vol. 8. – Suppl 2. – P. S160.
62. Bader, A. Recombinant human erythropoietin plays a pivotal role as a topical stem cell activator to reverse effects of damage to the skin in aging and trauma / A.Bader, H.G.Machens // *Rejuvenation Research.* – 2010. – Vol.13. – № 4. – P. 499-501.
63. Badylak, S.F. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function / S.F.Badylak, D.O.Freytes, T.W.Gilbert // *Acta Biomaterialia.* – 2009. – Vol. 5. – № 1. – P. 1-13.
64. Baiguera, S. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation / S.Baiguera, P.Jungebluth, A.Burns, C.Mavilia, J.Haag [et al.] // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31. – № 34. – P. 8931-8938.
65. Baiguera, S. Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues / S.Baiguera, P.Jungebluth, F.Burns [et al.] // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – № 14. – P. 3662-3672.
66. Barczak, W. The importance of stem cell engineering in head and neck oncology / W. Barczak, P. Golusiński, L. Luczewski [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 2016. – Vol. 38. – № 10. – P. 1665-1672.
67. Bartaula-Brevik, S. Angiogenic and Immunomodulatory Properties of Endothelial and Mesenchymal Stem Cells / S.Bartaula-Brevik, T.O.Pedersen, A.Finne-Wistrand [et al.] // *Tissue Eng. Part A* – 2016. – Vol. 22 – № 3–4– P. 244-252.
68. 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. Kovacs [et al.] // *Tissue Eng Part A.* – 2014. – № 20. – P. 389-397.

69. Ben-Ami, E. T-cells from autoimmune patients display reduced sensitivity to immunoregulation by mesenchymal stem cells: role of IL-2 67. / E.Ben-Ami, A. Miller, S. Berrih-Aknin // *Autoimmunity reviews*. – 2014. – Vol. 13. – № 2. – P. 187-196.
70. Bieback, K. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction / K.Bieback, P.Wuchter, D.Besser [et al.] // *Journal of Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 90. – № 7. – P. 773-782.
71. Bonnier, F. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models / F. Bonnier, M.E. Keating, T.P. Wrobel [et al.] // *Toxicology in Vitro*. – 2015. – № 29. – P. 124-131.
72. Bonfield, T.L. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo / T.L.Bonfield, M.T.Nolan (Koloze), D.P.Lennon [et al.] // *J Inflamm*. – 2010. – № 7. – P. 51.
73. Brines, M. The Therapeutic Potential of Erythropoiesis-Stimulating Agents for Tissue Protection: A Tale of Two Receptors / M.Brines // *Blood Purification*. – 2010. – Vol.29. – № 2. – P. 86-92.
74. Brivanlou, A.H. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. / A.H.Brivanlou, F.H.Gage, R.Jaenisch [et al.] // *Science* – 2003. – Vol. 300 – № 5621– P. 913-916.
75. Brouard, N. G-CSF increases mesenchymal precursor cell numbers in the bone marrow via an indirect mechanism involving osteoclast-mediated bone resorption / N.Brouard, R.Driessen, B.Short [et al.] // *J. Stem Cell*. – 2010. – № 5. – P. 65-75.
76. Broxmeyer, H.E. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. / H.E.Broxmeyer // *J. Exp. Med*. – 2013. – Vol. 210. – № 2– P. 205-208.
77. Campbell, N.G. Cell size critically determines initial retention of bone marrow mononuclear cells in the heart after intracoronary injection: evidence from a rat model / N.G.Campbell, M.Kaneko, Y.Shintani [et al.] // *PloS One*. – 2016. – Vol.11. – № 7. – P. e0158232.
78. Campinez, M.D. A new biodegradable polythiourethane as controlled release

- matrix polymer / M.D.Campinez, C.Ferris, M.V. de Paz [et al.] // International journal of pharmaceutics. – 2015. – № 480. – P. 63-72.
79. Cao, F. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up / F.Cao, D.Sun, C.Li [et al.] // European Heart Journal. – 2009. – №30. – P. 1986-1994.
 80. Caplan, A.I. The MSC: an injury drugstore / A.I. Caplan, D. Correa // Cell Stem Cell. – 2011. – № 9. – P. 11-15.
 81. Carballo-Molina, O.A. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries / O.A. Carballo-Molina, I. Velasco // Frontiers in cellular neuroscience. – 2015. – Vol.9. – № 13. – P. 1-12.
 82. Chapel, A. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome / A. Chapel, J.M. Bertho, M. Bensidhoum [et al.] // J Gene Med – 2003 – № 5 – P. 1028-1038.
 83. Chaouch, W. Properties modification of PET vascular prostheses / W. Chaouch, F. Dieval, N. Chakfe // J Phys Org Chem. – 2009. – № 22. – P.550-558.
 84. Chekhonin V.P. VEGF in tumor progression and targeted therapy / V.P. Chekhonin, S.A. Shein, A.A. Korchagina [et al.] // Curr. Cancer Drug Targets – 2013. – Vol. 13 – № 4– P. 423-443.
 85. Chiang, T. Clinical Translation of Tissue Engineered Trachea Grafts / T. Chiang, V. Pepper, C. Best [et al.] // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 2016. – Vol. 125 – № 11– P. 873-885.
 86. Chistiakov, D.A. Endogenous and exogenous stem cells: a role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation / D.A. Chistiakov // Journal of Biomedical Science. – 2010. – Vol.17. – №1. – P.92-101.
 87. Clark, E.S. Effect of cell seeding on neotissue formation in a tissue engineered trachea / E.S. Clark, C. Best, E. Onwuka [et al.] // J Pediatr Surg. – 2016. – Vol. 51. – № 1. – P. 49-55.
 88. Conese, M. Paracrine effects and heterogeneity of marrow-derived stem/progenitor

- cells: relevance for the treatment of respiratory diseases / M. Conese, A. Carbone, S. Castellani [et al.] // *Cells Tissues Organs*. – 2013. – Vol. 197. – № 6. – P. 445-473.
89. Crowley, C. Trachea transplantation: From laboratory to patient / C. Crowley, M. Birchall, A.M. Seifalian // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2015. – T. 9. – № 4. – P. 357-367.
 90. Cukierman, E. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension / E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens [et al.] // *Science* – 2001. – Vol. 294. – № 5547. – P. 1708-1712.
 91. D'Andrilli, A. Subglottic tracheal stenosis / A. D'Andrilli, F. Venuta, E.A. Rendina // *Journal of thoracic disease*. – 2016. – Vol. 8. – Suppl 2. – P. S140.
 92. De Becker, A. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? / A. De Becker, I. Van Riet // *World journal of stem cells*. – 2016. – Vol. 8. – № 3. – P. 73.
 93. De Coppi, P. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy / P. De Coppi, G. Bartsch, M.M. Siddiqui [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2007. – Vol. 25. – № 1. – P. 100-106. doi:10.1038/nbt1274
 94. Delaere, P. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy / P. Delaere, J. Vranckx, G. Verleden [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 362. – № 2. – P. 138-145.
 95. Delaere P.R. Tracheal transplantation // *Current opinion in pulmonary medicine*. – 2012. – Vol.18. – № 4. – P. 313-320.
 96. Denburg, J. A. Bone marrow progenitors in inflammation and repair: new vistas in respiratory biology and pathophysiology / J.A. Denburg, S.F. vanEeden // *Eur Respir J*. – 2006. – № 27. – P. 441-445.
 97. Delewi, R. Impact of intracoronary bone marrow cell therapy on left ventricular function in the setting of ST-segment elevation myocardial infarction: A collaborative meta-analysis / R. Delewi, A. Hirsch, J.G. Tijssen [et al.] // *Eur. Heart J*. – 2014. – Vol. 35 – № 15– P. 989-998.
 98. Detta, N. Melt electrospinning of polycaprolactone and its blends with

- poly(ethylene glycol) / N. Detta, T.D. Brown, F.K. Edin [et al.] // Polym. Int. – 2010. – Vol. 59 – № 11 – P. 1558-1562.
99. Devine, S.M. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates / S.M. Devine, C. Cobbs, M. Jennings [et al.] // Blood – 2003 – № 101 – P. 2999-3001.
 100. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.] // Cytotherapy – 2006. – Vol. 8 – № 4 – P. 315-317.
 101. Doolin, E.J. Engineering a composite neotrachea with surgical adhesives / E.J. Doolin, L.F. Strande, X. Sheng [et al.] // Journal of pediatric surgery. – 2002. – Vol. 37. – № 7. – P. 1034-1037.
 102. Doss, A.E. Tracheal replacements: Part 2. / A.E. Doss, S.S. Dunn, K.A. Kucera [et al.] // ASAIO J. – 2007. – Vol. 53. – № 5 – P. 631-639.
 103. Dorati, R. Design of 3D scaffolds for tissue engineering testing a tough polylactide-based graft copolymer / R. Dorati, C. Colonna, C. Tomasi [et al.] // Mater. Sci. Eng. C – 2014. – Vol. 34. – № 1 – P. 130-139.
 104. Ehrenreich, M. Update on tissue – engineering biological dressings / M.Ehrenreich, Z. Ruszczak // Tissue Eng. – 2006. – Vol. 12. – №. 9. – P. 2407-2424.
 105. Elliott, M.J. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study / M.J. Elliott, P. De Coppi, S. Speggorin [et al.] // Lancet. – 2012. – Vol. 380. – № 9846. – P. 994-1000.
 106. Feisst, V. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells / V. Feisst, S. Meidinger, M.B. Locke // Stem cells and cloning: advances and applications. – 2015. – Vol. 8. – P. 149.
 107. Fishman, J.M. Stem cell-based organ replacements - airway and lung tissue engineering / J.M. Fishman, M. Lowdell, M.A. Birchall // Semin. Pediatr. Surg. – 2014. – Vol. 23. – № 10558586 – P. 119-126.
 108. Foroulis, C. N. Pericardial patch tracheoplasty for the repair of a long, multisegmental postintubation tracheal damage / C.N. Foroulis, G.Karapanagiotidis, C. Papakonstantinou // Artificial organs. – 2012. – Vol. 36.

- № 9. – P. 835-839.
109. Fortin, M. Self-expandable metallic stents in nonmalignant large airway disease / M. Fortin, P. MacEachern, C.A. Hergott [et al.] // Canadian respiratory journal. – 2015. – Vol. 22. – № 4. – P. 235-236.
 110. Gandhimathi, C. Biomimetic hybrid nanofibrous substrates for mesenchymal stem cells differentiation into osteogenic cells / C. Gandhimathi, J.R. Venugopal, A.Y. Tham [et al.] // Materials Science and Engineering: C. – 2015. – Vol. 49. – P. 776-785.
 111. Garcia, O. Cell-based therapies for lung disease / O. Garcia, G. Carraro, S. Navarro [et al.] // Br. Med. Bull. – 2012. – Vol. 101. – № 1. – P. 147-161.
 112. Gelinsky, M. Bioreactors in tissue engineering: Advances in stem cell culture and three-dimensional tissue constructs / M. Gelinsky, A. Bernhardt, F. Milan // Eng. Life Sci. – 2015. – Vol. 15. – № 7. – P. 670-677.
 113. 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 [et al.] // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2010. – Vol. 139. – № 2. – P. 437-443.
 114. Gonfiotti, A. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results / A. Gonfiotti, M.O. Jaus, D. Barale [et al.] // Lancet – 2014. – Vol. 383 – № 9913– P. 238-244.
 115. Gontan, C. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation / C. Gontan, A. DeMunck, M. Vermeij [et al.] // Dev. Biol. – 2008. – Vol. 317 – № 1– P. 296-309.
 116. Grimmer, J.F. Tracheal reconstruction using tissue-engineered cartilage / J.F.Grimmer, C.B. Gunnlaugsson, E. Alsberg [et al.] // Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery. – 2004. – Vol. 130. – № 10. – P. 1191-1196.
 117. Grillo, H.C. Surgery of the trachea and bronchi / H.C. Grillo // London.: BC Decker Inc Hamilton, 2004. – P. 888.
 118. Guo, X. Comparison of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation and mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in experimental spinal

- injury / X. Guo, X. Bu, Z. Li [et al.] // *Int. J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 122 – № 12. – P. 723-733.
119. Gustafsson, Y. Viability and proliferation of rat MSCs on adhesion protein-modified PET and PU scaffolds / Y. Gustafsson, J. Haag, P. Jungebluth [et al.] // *Biomaterials* – 2012. – Vol. 33 – № 32. – P. 8094-8103.
 120. Healy, K.E. Bone tissue engineering / K.E. Healy, R.E. Guldberg // *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* – 2007. – № 7. – P. 328-330.
 121. Henrich, D. Characterization of bone marrow mononuclear cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro / D. Henrich, R. Verboket, A. Schaible [et al.] // *BioMed research international.* – 2015. – Vol. 2015. doi: 10.1155/2015/762407.
 122. Hertegard, S. Tissue engineering in the larynx and airway / S. Hertegard // *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2016. – Vol.24. – No 6. – P. 469-476.
 123. Hinderer, S. Engineering of fibrillar decorin matrices for a tissue-engineered trachea / S. Hinderer, M. Schesny, A. Bayrak [et al.] // *Biomaterials* – 2012. – Vol. 33 – № 21– P. 5259-5266.
 124. Homicz, M.R. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition / M.R. Homicz, B.L. Schumacher, R.L. Sah [et al.] // *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* – 2002. – Vol. 127 – № 5 – P. 398-408.
 125. Huang, N.F. Regulation of the matrix microenvironment for stem cell engineering and regenerative medicine / N.F. Huang, S.Li // *Ann. Biomed. Eng.* – 2011. – Vol. 39 – № 4– P. 1201-1214.
 126. Huang, Y.C. The potential role of microvesicles in mesenchymal stem cell-based therapy / Y.C. Huang, O. Parolini, L.Deng // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol.22. – № 6 – C. 841-844.
 127. Huang, Y.C. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc / Y.C.Huang, V.Y.Leung, W.W.Lu [et al.] // *Spine J.* – 2013. – Vol.13 – № 3. – P. 352-362.
 128. Ichim, T.E. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy / T.E.Ichim, D.T.Alexandrescu, F.Solano [et al.] // *Cellular immunology.* – 2010. – Vol. 260. – №. 2. – P. 75-82.

129. Itskovitz-Eldor, J. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers / J.Itskovitz-Eldor, M.Schuldiner, D.Karsenti [et al.] // *Mol Med.* – 2000. – №6. – P. 88-95.
130. Jacobs, S. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells / S.A.Jacobs, V.D.Roobrouck, C.M.Verfaillie [et al.] // *Immunol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 91 – № 1– P. 32-39.
131. Jaillard, S. Tracheal replacement by allogenic aorta in the pig / S. Jaillard, M. Holder-Espinasse, T. Hubert [et al.] // *CHEST Journal.* – 2006. – Vol. 130. – №. 5. – P. 1397-1404.
132. Jeffries, E.M. Highly elastic and suturable electrospun poly(glycerol sebacate) fibrous scaffolds / E.M.Jeffries, R.A.Allen, J.Gao [et al.] // *Acta Biomater.* – 2015. – Vol. 18 – P. 30-39.
133. Jones, E. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. / E. Jones, D. McGonagle // *Rheumatology (Oxford).* – 2008. – Vol. 47 – № 2 – P. 126-131.
134. Joo, Y.H. Morphologic assessment of polycaprolactone scaffolds for tracheal transplantation in a rabbit model / Y.H.Joo, J.H.Park, D.W.Cho [et al.] // *Tissue Eng. Regen. Med.* – 2013. – Vol. 10 – № 2 – P. 65-70.
135. 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. – №. 9808. – P. 1997-2004.
136. Jungebluth, P. The concept of in vivo airway tissue engineering / P. Jungebluth, A. Bader, S. Baiguera [et al.] // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – № 17. – P. 4319-4326.
137. Jungebluth, P. Verification of cell viability in bioengineered tissues and organs before clinical transplantation / P. Jungebluth, J.C. Haag, M.L. Lim [et al.] // *Biomaterials* – 2013. – Vol. 34 – № 16– P. 4057-4067.
138. Kanzaki, M. Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea / M. Kanzaki, M. Yamato, H. Hatakeyama [et al.] // *Tissue Eng.* – 2006. – Vol. 12. – № 5– P.1275-1283.
139. Kathuria, N. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering / N. Kathuria, A. Tripathi, K.K. Kar [et al.]

- // Acta Biomater. – 2009. – Vol. 5 – № 1 – P. 406-418.
140. Kauser, K. Bone marrow-derived progenitors. Handbook of experimental pharmacology / K. Kauser, A.M. Zeiher // Springer.: New York, 2007. – Vol. 180. – P. 298.
 141. Kobayashi, K. Potential of heterotopic fibroblasts as autologous transplanted cells for tracheal epithelial regeneration. / K.Kobayashi, T.Suzuki, Y.Nomoto [et al.] // Tissue Eng. – 2007. – Vol. 13 – № 9 – P. 2175-2184.
 142. Kobayashi, K. A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells / K. Kobayashi, T. Suzuki, Y. Nomoto [et al.] // Biomaterials – 2010. – Vol. 31 – № 18 – P. 4855-4863.
 143. Kojima, K. A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells / K.Kojima // FASEB J. – 2003. – Vol. 17 – № 8 – P.823-828.
 144. Kolker, A.C. The shared airway: management of the patient with airway pathology / A.C.Kolker // General Thoracic surgery / T.W. Shield, J. LoCicero, C.E. Reed, R.H. Feins – Seventh edition. – Lippincott Williams & Wilkins, 2005. – Vol. 1. – P. 369-381.
 145. Kolonin, M.G. Alternative origins of stroma in normal organs and disease / M.G. Kolonin // Stem Cell Res. – 2012. – Vol. 8. – № 2. – P. 312-323.
 146. Krause, D.S. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell / D.S.Krause, N.D.Theise, M.Collector [et al.] // Cell. – 2001. – Vol. 105. – № 3. – P. 369-377.
 147. Kucera, K.A. Tracheal replacements: part 1 / K.A.Kucera, A.E.Doss, S.S.Dunn [et al.] // ASAIO Journal. – 2007. – Vol. 53. – № 4. – P. 497-505.
 148. Kurobe, H. Comparison of the biological equivalence of two methods for isolating bone marrow mononuclear cells for fabricating tissue-engineered vascular grafts / H.Kurobe, S.Tara, M.W.Maxfield [et al.] // Tissue Engineering Part C: Methods. – 2014. – Vol. 21. – № 6. – P. 597-604.
 149. Lange, A. Sox17 promotes cell cycle progression and inhibits TGF- β /Smad3 signaling to initiate progenitor cell behavior in the respiratory epithelium. / A.Lange, A.Keiser, J.Wells [et al.] // PLoS One – 2009. - № 4 – P. e5711.

150. Lee, C. J. Tissue engineered tracheal prosthesis with acceleratedly cultured homologous chondrocytes as an alternative of tracheal reconstruction / C.J. Lee, K.D. Moon, H. Choi // *Journal of Cardiovascular Surgery*. – 2002. – Vol. 43. – № 2. – P. 275-279.
151. Levashov, Y.N. One stage allotransplantation of thoracic segment of the trachea in a patient with idiopathic fibrosing mediastinitis and marked tracheal stenosis / Y.N. Levashov, P.K. Yablonsky, S.M. Cherny [et al.] // *Eur J Cardiothorac Surg*. – 1993. – №7. – P. 383-386.
152. Lin, C.H. Surface modification of poly(e-caprolactone) porous scaffolds using gelatin hydrogel as the tracheal replacement / C.H. Lin, S.H. Hsu, J.M. Su [et al.] // *J. Tissue Eng. Regen. Med*. – 2011. – Vol. 5 – № 2 – P. 156-162.
153. Longhini-Dos-Santos, N. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema. / N. Longhini-Dos-Santos, V.A. Barbosa-de-Oliveira, R. H. Kozma [et al.] // *Stem Cell Rev*. – 2013. – Vol. 9 – № 2– P. 210-218.
154. Luo, Y. et al. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on graphene oxide-incorporated electrospun poly (lactic-co-glycolic acid) nanofibrous mats / Y. Luo, H. Shen, Y. Fang [et al.] // *ACS applied materials & interfaces*. – 2015. – Vol.7. – № 11. – P. 6331-6339.
155. Luffy, S.A. Evaluation of magnesium-yttrium alloy as an extraluminal tracheal stent / S. A. Luffy, D. T. Chou, J. Waterman [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* – 2014. – Vol. 102 – № 3– P. 611-620.
156. Macchiarini, P. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway / P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go [et al.] // *Lancet* – 2008. – Vol. 372 – № 9655. – P. 2023-2030.
157. Makris, D. Tracheal replacement with cryopreserved allogenic aorta / D.Makris, M.Holder-Espinasse, A.Wurtz [et al.] // *Chest*. – 2010. – №137. – P. 60-67.
158. Marahaini, M. Genotoxicity evaluation of dental restoration nanocomposite using comet assay and chromosome aberration test / M.Marahaini, P.M.Thirumulu, R. Ismail Ab // *Nanotechnology*. – 2013. – Vol.24. – № 1. – P. 015105 (13pp).

159. Martin I. Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products / I.Martin, T.Smith, D.Wendt // Trends Biotechnol. – 2009. – Vol. 27 – № 9– P. 495-502.
160. Martinod, E. Tracheal regeneration following tracheal replacement with an allogenic aorta / E. Martinod, A. Seguin, M. Holder-Espinasse, M. Kambouchner, M. Duterque-Coquillaud [et al.] // The Annals of thoracic surgery. – 2005. – Vol. 79. – №. 3. – P. 942-948.
161. Melchiorri, A.J. Mesenchymal stem cells: roles and relationships in vascularization / A.J. Melchiorri, B.-N.B. Nguyen, J.P. Fisher // Tissue engineering Part B. – 2014. – Vol.20. – №3. – P. 218-228.
162. Mildner, M. Secretome of peripheral blood mononuclear cells enhances wound healing / M. Mildner, S. Hacker, T. Haider [et al.] // PLoS One – 2013. – Vol. 8 – № 3. – P. e60103.
163. Moll, G. Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses / G. Moll, R. Jitschin, V. Bahr Lena [et al.] // PLoS One – 2011. – Vol. 6 – № 7. – P. e21703.
164. Montgomery, W.W. T-Tube tracheal stent / W.W. Montgomery // Archives of Otolaryngology. – 1965. – Vol. 82. – №. 3. – P. 320-321.
165. Moreno, M.J. Development of a compliant and cytocompatible micro-fibrous polyethylene terephthalate vascular scaffold / M.J.Moreno, A.Ajji, D.Mohebbi-Kalhari [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater. – 2011. – Vol. 97 – № 2– P. 201-214.
166. Mosmann, T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T.Mosmann // J Immunol Methods. – 1983. – Vol. 65– №1-2. – P. 55-63.
167. Mueller, M. Mesenchymal stem/stromal cells—a key mediator for regeneration after perinatal morbidity? / M.Mueller, T.G.A.Wolfs, A.Schoeberlein [et al.] // Mol. Cell. Pediatr. – 2016. – Vol. 3 – № 1– P .6.
168. Murphy, M.B. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine / M.B.Murphy, K.Moncivais, A.I.Caplan // Experimental

- & molecular medicine. – 2013. – Vol. 45. – №. 11. – P. e54.
169. Murgu, S. Central airway obstruction: benign strictures, tracheobronchomalacia and malignancy-related / S. Murgu, K. Egressy, B. Laxmanan, G. Doblare, R. Ortiz-Comino [et al.] // *Chest*. - 2016. – Vol.150. - №2. – P. 426-441.
 170. Musa, M. Genotoxicity evaluation of dental restoration nanocomposite using comet assay and chromosome aberration test. / M.Musa, K.T.Ponnuraj, D.Mohamad [et al.] // *Nanotechnology* – 2013. – Vol. 24 – № 1– P. 15105.
 171. Nakamura, T. In situ tissue engineering for tracheal reconstruction using a luminal remodeling type of artificial trachea / T.Nakamura, T.Sato, M.Araki [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2009. – Vol. 138 – № 4– P. 811-819.
 172. Nakamura, T. Tissue-engineered airway and “in situ tissue engineering” / T.Nakamura, K.Ohmori, S.I. Kanemaru // *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2011. – Vol. 59 – № 2– P. 91-97c.
 173. Niu, P. Transcriptional profiling of interleukin-2-primed human adipose derived mesenchymal stem cells revealed dramatic changes in stem cells response imposed by replicative senescence / P.Niu, A.Smagul, L.Wang [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – №. 20. – P. 17938.
 174. Nomoto, Y. Effect of fibroblasts on epithelial regeneration on the surface of a bioengineered trachea / Y. Nomoto, K. Kobayashi, Y. Tada [et al.] // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 2008. – Vol. 117 – № 1– P. 59–64.
 175. O’Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering / F. J. O’Brien // *Mater. Today* – 2011. – Vol. 14 – № 3 – P. 88–95.
 176. Okumura, T. Identification of a bone marrow-derived mesenchymal progenitor cell subset that can contribute to the gastric epithelium. / T.Okumura, S.S.W. Wang, S.Takaishi [et al.] // *Lab. Invest.* – 2009. – Vol. 89 – № 12 – P. 1410-1422.
 177. Omori, K. Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea / K.Omori, Y.Tada, T.Suzuki [et al.] // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2008. – Vol. 117. – №. 9. – P. 673-678.
 178. Orlic, D. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium / D.Orlic,

- J.Kajstura, S.Chimenti [et al.] // *Pediatr. Transplant.* – 2003. – Vol. 7. – Suppl 3. – № April – P. 86-88.
179. Papenburg, B. Design strategies for tissue engineering scaffold / B. Papenburg. - The Netherlands: Gildeprint, 2009. – P. 198.
 180. Park, I.-H. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. / I.-H.Park, R.Zhao, J.A.West [et al.] // *Nature* – 2008. – Vol. 451 – № 7175 – P. 141-146.
 181. Park, K.S. Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation / K.S. Park, Y.S. Kim, J.H. Kim [et al.] // *Transplantation* – 2010. – Vol. 89 – № 5– P. 509-517.
 182. Park, J.H. Management of benign tracheal strictures caused by tracheostomy / J.H. Park, J.H. Kim, H.Y. Song [et al.] // *Cardiovascular and interventional radiology.* – 2014. – Vol. 37. – №. 3. – P. 743-749.
 183. Peloso, A. Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering / A.Peloso, A.Dhal, J.P.Zambon [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6 – № 1– P. 107.
 184. Perl, L. Cellular therapy in 2010: Focus on autoimmune and cardiac diseases // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2010. – Vol. 12. – № 2. – P. 110-115.
 185. Petrella, F. Current perspectives in mesenchymal stromal cell therapies for airway tissue defects / F. Petrella, S. Rizzo, A. Borri [et al.] // *Stem cells international.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 7.
 186. Pfenninger, C. Tracheal remodeling: comparison of different composite cultures consisting of human respiratory epithelial cells and human chondrocytes / C. Pfenninger, I. Leinhase, M. Endres [et al.] // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal.* – 2007. – Vol. 43. – №. 1. – P. 28-36.
 187. Pitkin, Z. New phase of growth for xenogeneic-based bioartificial organs / Z. Pitkin // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17. – № 9 – P. 1593.
 188. Plunkett, N. Bioreactors in tissue engineering. / N.Plunkett, F.J.O'Brien // *Technology and Health Care.* – 2011. – Vol. 19. – №. 1. – P. 55-69.

189. Prasad, V.K., Umbilical cord blood transplantation for non-malignant diseases / V.K. Prasad, J. Kurtzberg // Bone marrow transplantation. – 2009. – Vol. 44. – №. 10. – P. 643-651.
190. Rankin, S.M. Chemokines and adult bone marrow stem cells / S.M. Rankin // Immunol. Lett. – 2012. – Vol. 145 – № 1-2 – P. 47-54.
191. Rastegar, F. Mesenchymal stem cells: molecular characteristics and clinical applications. / F. Rastegar, D. Shenaq, J. Huang [et al.] // World J. Stem Cells – 2010. – Vol. 2 – № 4 – P. 67-80.
192. Ray, S. Mobilization of progenitor cells into peripheral blood by gamma-tocotrienol: A promising radiation countermeasure / S. Ray, S.S. Kulkarni, K. Chakraborty [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2013. – Vol. 15 – № 3 – P. 557-564.
193. Richardson, S.M. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. / S.M. Richardson, G. Kalamegam, P.N. Pushparaj [et al.] // Methods – 2016. – Vol. 99 – P. 69-80.
194. Rim, N.G. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering / N.G. Rim, C.S. Shin, H. Shin // Biomed. Mater. – 2013. – Vol. 8 – № 1 – P. 014102.
195. Rochefort, G.Y. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. / G.Y. Rochefort, B. Delorme, A. Lopez [et al.] // Stem Cells – 2006. – Vol. 24 – № 10 – P. 2202-2208.
196. Rose, K.G. Tracheal allotransplantation in man / K.G. Rose, K. Sesterhenn, F. Wustrow // Lancet. – 1979. – Vol. 24. – № 1. – P. 433.
197. Ruszymah, B.H.I. Formation of in vivo tissue engineered human hyaline cartilage in the shape of a trachea with internal support / B.H.I. Ruszymah, K. Chua, M.A. Latif [et al.] // International journal of paediatric otorhinolaryngology. – 2005. – Vol. 69. – №. 11. – P. 1489-1495.
198. Sachs, L.A. Effects of media on differentiation of cultured human tracheal epithelium / L.A. Sachs, W.E. Finkbeiner, J.H. Widdicombe // Vitro. Cell. Dev. Biol. – 2003. – Vol. 39 – № 1-2 – P. 56-62.
199. Saito, Y. Airway stenting / Y. Saito, H. Imamura // Surgery today. – 2005. –

- Vol. 35. – №. 4. – P. 265-270.
200. Schoeberlein, A. Homing of placenta-derived mesenchymal stem cells after perinatal intracerebral transplantation in a rat model / A. Schoeberlein, M. Mueller, U. Reinhart [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 2011. – Vol. 205. – №. 3. – P. 277.e1.
 201. Schraufstatter, I.U. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. / I.U. Schraufstatter, R.G. Discipio, M. Zhao, S.K. Khaldoyanidi // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182– P. 3827-3836.
 202. Sharma, R.R. Mesenchymal stem or stromal cells: A review of clinical applications and manufacturing practices // Transfusion. – 2014. – Vol. 54. – № 5. – P. 1418-1437.
 203. Sheikh, F.A. Hybrid scaffolds based on PLGA and silk for bone tissue engineering / F.A. Sheikh, H.W. Ju, B.M. Moon [et al.] // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2016. – Vol. 10 – № 3– P. 209-221.
 204. Shi, Z. Enhanced endothelial differentiation of adipose-derived stem cells by substrate nanotopography / Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang [et al.] // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2014. – Vol. 8 – № 1– P. 50-58.
 205. Sohni, A. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking / A. Sohni, C.M. Verfaillie // Stem Cells International. – 2013. – P.8.
 206. Sorg, H. The nonhematopoietic effects of erythropoietin in skin regeneration and repair: from basic research to clinical use / H. Sorg, Y. Harder, C. Krueger [et al.] // Med. Res. Rev. – 2013. – Vol. 33 – № 3– P. 637-664.
 207. Spaeth, E. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. / E. Spaeth, A. Klopp, J. Dembinski [et al.] // Gene Ther. – 2008. – Vol. 15 – № 10 – P. 730-738.
 208. Spees, J.L. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma / J.L. Spees, S.D. Olson, J. Ylostalo [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A – 2003. – Vol. 100 – P. 2397-2402.
 209. Stabler, C.T. Mesenchymal stem cells for therapeutic applications in pulmonary

- medicine / C.T. Stabler, S. Lecht, P. Lazarovici [et al.] // Br. Med. Bull. – 2015. – Vol. 115 – № 1 – P. 45-56.
210. Steinhoff, G. Regenerative medicine / G. Steinhoff – Springer Dordrecht Heidelberg: London New York, 2013. – P. 1220.
 211. Stoelben, E. Benign stenosis of the trachea / E.Stoelben, A.Koryllos, F.Beckers [et al.] // Thoracic surgery clinics. – 2014. – Vol. 24. – №. 1. – P.5 9-65.
 212. Suzuki, T. Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells / T. Suzuki, K. Kobayashi, Y. Tada [et al.] // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 2008. – Vol. 117 – № 6 – P. 453-463.
 213. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // Cell – 2006. – Vol. 126 – № 4 – P. 663-676.
 214. Tsukada, H. Tracheal replacement with a bioabsorbable scaffold in sheep / H. Tsukada, S. Gangadharan, R. Garland [et al.] //The Annals of thoracic surgery. – 2010. – Vol. 90. – №. 6. – P. 1793-1797.
 215. Zhang, F. Special issue on circuits in metabolic engineering / F. Zhang // ACS Synth. Biol. – 2015. – Vol. 4 – № 2 – P. 93-94.
 216. Zhdanov, V.V. Mechanism of mobilization of mesenchymal stem cell under the effect of granulocyte colony-stimulating factor / V.V. Zhdanov, L.A. Stavrova, A.M. Dygai [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. – 2007. – Vol. 144 – № 1 – P.1 51-153.
 217. Zvaifler N.J. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals / N.J. Zvaifler, L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams [et al.] // Arthritis Res – 2000. – Vol. 2 – № 6 – P. 477-488.
 218. Vacanti, C.A. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage / C.A. Vacanti, K.T. Paige, W.S. Kim [et al.] // J Pediatr Surg. – 1994. - № 29 – P. 201-205.
 219. Vats, A. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: A review of clinical applications // Clin. Otolaryngol. Allied Sci. – 2003. – Vol. 28. – № 3. – P.165-172.
 220. Visage, C. Le Coculture of mesenchymal stem cells and respiratory epithelial cells to engineer a human composite respiratory mucosa. / C.Le Visage, B. Dunham,

- P. Flint [et al.] // *Tissue Eng.* – 2004. – Vol. 10 – № 9-10 – P. 1426-1435.
221. Vitale, A.M. Induced pluripotent stem cells: a new technology to study human diseases. / A.M. Vitale, E.Wolvetang, A.Mackay-Sim // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 43 – № 6 – P. 843-846.
 222. Yagi, H. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing / H.Yagi, A.Soto-Gutierrez, B.Parekkadan [et al.] // *Cell Transpl.* – 2010. – Vol. 19 – № 6 – P. 667-679.
 223. Yan, B. PLGA-PTMC-cultured bone mesenchymal stem cell scaffold enhances cartilage regeneration in tissue-engineered tracheal transplantation / B.Yan, Z.Zhang, X.Wang [et al.] // *Artif Organs.* – 2017. – Vol. 41. – № 5. – P. 461-469.
 224. Yang, L. Tissue engineered cartilage generated from human trachea using DegraPol scaffold / L.Yang, S. Korom, M. Welti [et al.] // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2003. – № 24. – P. 201-207.
 225. Yang, W.Z. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions / W.Z. Yang, Y. Zhang, F. Wu [et al.] // *Journal of translational medicine.* – 2010. – Vol. 8. – №. 1. – P. 75.
 226. Yang, B. Various cell populations within the mononuclear fraction of bone marrow contribute to the beneficial effects of autologous bone marrow cell therapy in a rodent stroke model / B. Yang, K. Parsha, K. Schaar [et al.] // *Transl. Stroke Res.* – 2016. – Vol. 7 – № 4 – P. 322-330.
 227. Walles, T. Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized trachea / T. Walles, B. Giere, M. Hofmann [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2004. – Vol. 128 – № 6 – P. 900-906.
 228. Wei, A. Mesenchymal stem cells: potential application in intervertebral disc regeneration. / A. Wei, B. Shen, L. Williams [et al.] // *Transl. Pediatr.* – 2014. – Vol. 3 – № 2 – P. 71-90.
 229. Weidenbecher, M. Hyaluronan-based scaffolds to tissue-engineer cartilage implants for laryngotracheal reconstruction. / M. Weidenbecher, J.H. Henderson, H.M. Tucker [et al.] // *Laryngoscope* – 2007. – Vol. 117 – № 10 – P. 1745-1749.
 230. Weiss, D.J. Stem cells, cell therapies, and bioengineering in lung biology and

- diseases. Comprehensive review of the recent literature 2010-2012. / D.J. Weiss // *Ann. Am. Thorac. Soc.* – 2013. – Vol. 10 – № 5 – P. S45-S97.
231. Welman, T. Bioengineering for organ transplantation: progress and challenges / T. Welman, S. Michel, N. Segaren [et al.] // *Bioengineered* – 2015. – Vol. 6 – № 5 – P. 257-261.
 232. Wobus, A.M. Stem cells / Edit.: A.M Wobus, K.R. Boheler // Springer.: Berlin. Germany. – 2006. – Vol. 174 – P.414.
 233. Wormald, J.C. Regenerative medicine in otorhinolaryngology / J.C. Wormald, J.M. Fishman, S. Juniat // *J Laryngol Otol.* – 2015. – Vol. 129. – № 8. – P. 732-739.
 234. Wise, J.K. Comparison of uncultured marrow mononuclear cells and culture-expanded mesenchymal stem cells in 3D collagen-chitosan microbeads for orthopedic tissue engineering / J.K. Wise, A.I. Alford, S.A. Goldstein [et al.] // *Tissue Engineering Part A.* – 2013. – Vol. 20. – №. 1-2. – P. 210-224.
 235. Wu, W. Engineering of human tracheal tissue with collagen-enforced poly-lactic-glycolic acid non-woven mesh: a preliminary study in nude mice / W. Wu, X. Feng, T. Mao [et al.] // *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* – 2007. – Vol. 45 – № 4 – P. 272-278.