



С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ, Г. Г. МАРИНОВИЧ,
А. И. ДРАПЕЗА, И. В. МАРИНОВИЧ,
В. А. ЛОБАН, А. Н. ЛИСИЧЕНОК

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

Белорусский государственный университет

Для науки конца XX — начала XXI века характерно бурное развитие физико-химических направлений медицины, предметом которых является изучение механизмов жизнедеятельности на уровне клетки, ее субклеточных и молекулярных структур. На основе достижений физико-химической биологии создаются перспективные, принципиально новые технологии для различных отраслей биотехнологической промышленности и медицины.

Традиционные биотехнологии для получения ценных биологически активных веществ основаны на использовании целых организмов (микроорганизмы, растения, животные), однако современная биотехнология нацелена на культивирование свободных и иммобилизованных клеток.

Методы получения и использования функционально активных клеточных культур широко применяются во всем мире для решения фундаментальных и прикладных вопросов современной биомедицины. Использование клеточных технологий составляет основу современной восстановительной заместительной медицины, целью которой является разработка методов восстановления морфологических и функциональных характеристик органов человека путем стимуляции биологической активности клеток или замены поврежденных клеток (тканей) на функционально активные клетки (ткани) [53].

Достижения биофизики, биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии сделали клетку не только главным объектом воздействия, но и средством лечения многих заболеваний. Так, уже сейчас для лечения сахарного диабета успешно используются трансплантаты из культур островковых клеток поджелудочной железы, для лечения различных форм печеночной недостаточности применяется экстракорпоральное подключение донорских изолированных гепатоцитов, при болезни Паркинсона нашли применение методы нейротрансплантации, клеточная терапия используется для лечения скелетно-мышечных заболеваний, болезни Альцгеймера, болезней сердца и печени и т. д.

Между тем возможности клеточных технологий в медицине остаются малоизученными и недостаточно реализованными. Одной из причин этого является отсутствие ясности в реализации ряда технологий культивирования клеток и в методологических подходах синтеза на их основе биологически активных препаратов.

В настоящем обзоре обобщены и проанализированы современные данные об использовании клеточных технологий в медицине, описаны варианты аппаратно-технического обеспечения данных технологий для того, чтобы стимулировать дальнейший интерес специалистов к проблеме использования и развития клеточных технологий. Ос-

новное внимание в статье уделяется рассмотрению достижений в области клеточной и тканевой инженерии, а также методам культивирования клеток.

Клеточная инженерия

Следствием развития клеточной биологии и биофизики явилось формирование нового направления клеточной (тканевой) инженерии, относящегося к биомедицинской технологии и основанной на использовании культивируемых клеток человека. Задача этого направления заключается в обеспечении замещения или восстановления поврежденных тканей путем имплантации или трансплантации выращенных *in vitro* клеток из здоровых тканей и органов [57]. Возможность культивирования в достаточном объеме необходимых для практики клеток делает реальным их использование в клинике.

Первые эксперименты по пересадке ткани проведены еще в 1933 г., когда опухолевые клетки мыши, заключенные в полиэтиленовую мембрану, пересадили в брюшную полость свиньи [8]. В 1975 г. опубликованы результаты использования островковых клеток поджелудочной железы, заключенных в полупроницаемую мембрану, для регулирования уровня глюкозы в крови больных диабетом людей [15]. Закрывание ожоговых поверхностей с помощью культивированных кератиноцитов в коллагеновом геле или композиционной смеси коллагена и гликозамингликанов впервые выполнено в 1980 г. [6, 12]. В настоящее время трансплантаты из культивируемых кератиноцитов уже получили клиническое применение.

Впервые термин "тканевая инженерия" использован в 1984 г. при описании процессов образования эндотелий-подобной структуры на полиметилметакрилатовой поверхности глазного протеза [64]. В настоящее время этот термин применяется для обозначения совокупности методов, использующих комбинацию клеток, "опорного" материала или каркаса и биоактивных пептидов для управления процессами репарации или формирования тканей организма [9]. Одним из первых примеров в этой области исследований является демонстрация роста гепатоцитов на полых волоконных трубках [37]. В конце 80-х годов для формирования новой ткани в качестве каркаса для клеток использовали синтетические распадающиеся полимеры [66]. Системы содержали большие поры для переноса необходимой массы клеток. После имплантации начинался ангиогенез и формировалась новая васкуляризованная ткань.

Современная клеточная (тканевая) инженерия является междисциплинарной областью исследования, в которой для сохранения, поддержания и улучшения функционирования тканей организма используются биологические заместители [44]. На рис. 1 схематически проиллюстрирована взаимосвязь основных элементов, составляющих основу методов клеточной инженерии.

К настоящему времени методы клеточной инженерии нашли применение в отношении практически всех тканей организма. Значительное развитие получили ортопедические и челюстно-лицевые операции, при которых осуществляется инженерия костной ткани [48], хрящей [16], сухожилий [13], связок [35] и кожи [6]. При лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы применяют инженерию кла-

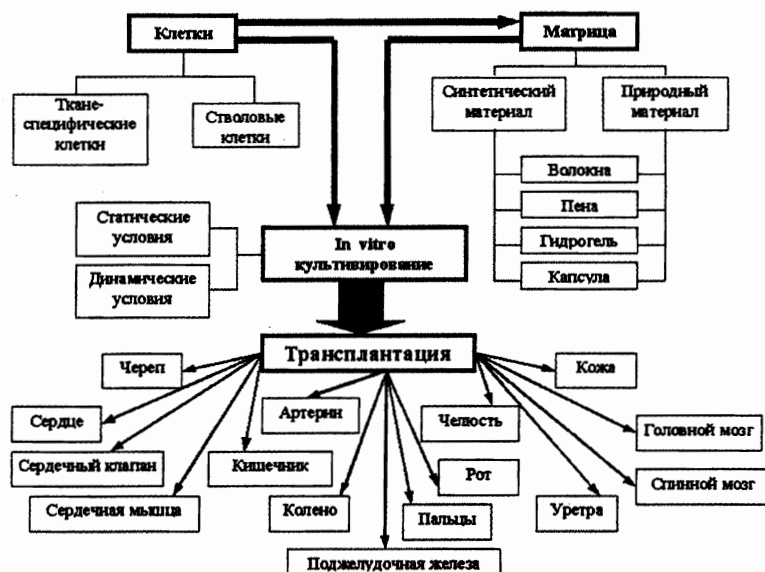


Рис. 1. Основные элементы технологий в клеточной инженерии

панов сердца [19] и кровяных сосудов [38]. В эндокринологии используют инкапсулированные островковые клетки поджелудочной железы [45], в неврологии с помощью методов клеточной инженерии осуществляют регенерацию периферических нервов [26] и спинного мозга [4]. В стоматологии применяют инженерию периодонтальной ткани [5] и дентина [49], в офтальмологии — роговицы [14] и хрусталика [51].

Большинство трансплантатов в клеточной инженерии состоят из двух основных компонентов: группы клеток и искусственного каркаса, на котором могут расти клетки. Оба элемента играют важную роль в развитии новой ткани. Клеточный компонент необходим для генерации новой ткани посредством образования внеклеточного матрикса. Искусственные носители обеспечивают кратковременную механическую стабильность и служат шаблоном для трехмерной организации развивающейся ткани.

Матрицы или искусственные носители

Большинство материалов, используемых как субстраты или инкапсулирующие материалы для клеток млекопитающих, являются синтетическими (молочно-гликолевая кислота или полуакрилонитрилполивинил хлорид) или природными (коллаген, гидроксиапатит или алгинат) [65]. Основной целью использования искусственных материалов в области клеточной инженерии является создание механической основы для трехмерной организации ткани. По мере нарастания биологического материала функцию образования ткани принимает на себя формирующийся внеклеточный матрикс. Поэтому наибольший интерес у исследователей вызывают биоразлагаемые материалы.

В клеточной инженерии используют различные биоразлагаемые материалы, включая биокерамику и полимеры. Впервые керамику применили в клеточной инженерии костной ткани [11]. В данных работах пористый гидроксиапатит использовали в качестве носителя клеток, полученных из надкостницы или костного мозга. В основном у керамических материалов долгий полупериод распада в условиях *in vivo* [30].

Более широкое распространение в качестве матриц для трансплантатов получили полимеры. Длительность полупериода распада полимеров в живых системах изменяется от нескольких дней до нескольких месяцев [47]. Полимеры используют в виде волокнистой сетки, пористой губки или пены, а также в виде гидрогеля. Наиболее часто используемыми в волокнистой сетке или пене полимерами являются линейные полиэфиры (полигликолиевая и полимолочная кислоты, поликапролактон, полиэтиленгликоль) и естественные полимеры (коллаген и гиалуроновая кислота) [25]. Полимерные гликогели инжестируют в организм, что позволяет проводить менее инвазивную доставку имплантатов, тем самым уменьшается хирургический риск [60]. Гидрогелевые субстраты включают сополимеры оксидов полиэтилена и полипропилена и естественные полимеры, в том числе алгинат и агарозу. В тканевой инженерии хрящей для повышения хондрогенеза предложено использовать хитозансодержащие полисахаридные гели [21].

Материалы для клеточного каркаса играют ключевую роль в обеспечении механической стабильности имплантатов до тех пор, пока клеточный биосинтез не приведет к созданию внеклеточного матрикса. Необходимость обеспечения сходства механических свойств материала и ткани часто определяет выбор материала, используемого для создания матрицы. Например, матрицы для репарации костной ткани содержат керамический гидроксиапатит, обладающий жесткостью кости; матрицы для репарации хрящей и связок — более эластичные материалы, такие как коллаген или агароза [46]. Матрицы клеточных имплантатов обеспечивают наряду с механической стабильностью уменьшение иммунного ответа на чужеродные клетки. Наиболее яркий пример этого — инкапсулирование островковых клеток поджелудочной железы при использовании клеточной инженерии в лечении диабета.

Многообещающими материалами для нужд клеточной инженерии являются полимеры, содержащие фрагменты молекул, обеспечивающих адгезию клеток. Такие полимеры усиливают адгезию клеток к носителю и облегчают управление развитием ткани. Синтезированы полимеры, содержащие аминокислотные последовательности интегринов в основной цепи или в ветвях [31].

Стволовые клетки — перспективный клеточный материал для клеточной инженерии

Тело человека состоит из 100 триллионов клеток, среди которых выделяют примерно 260 различных фенотипов. Эти клетки делятся, дифференцируются и объединяются, формируя ткани и органы организма.

В тканевой инженерии клеточный компонент для восстановления функций определенного типа ткани получают с помощью биопсии тканей самого пациента или его ближайших родственников. В ряде случаев извлечение тканеспецифического клеточного материала невозможно или сопряжено с хирургическим риском. Поэтому в настоящее время исследователи в области клеточных техноло-

гий все больше внимания уделяют работе со стволовыми клетками.

Стволовые клетки — это тотипотентные клетки бластоцист (эмбриональные стволовые клетки) и мультипотентные герминативные клетки энто-, экто- и мезодермы, дающие в эмбриогенезе начало всем тканям организма. Стволовые клетки и клетки-предшественники сохраняются в большинстве тканей зрелого организма и обеспечивают постоянную смену клеток при их физиологической смерти и повреждении. Такие "резервные" клетки можно отнести к органным стволовым клеткам, дальнейшая трансформация которых в зрелые клетки данной ткани определяется локальными факторами, специфическими только для этой ткани [63].

Стволовые клетки обладают высокой пролиферативной активностью и неограниченной способностью к самовоспроизведению при симметричном митозе. Показано, что популяция стволовых клеток, выделенных из мозга эмбриона человека, увеличивается при культивировании в среде, содержащей эпидермальный фактор роста, факторы роста фибробластов и ингибирования лейкемии в 10^6 раз, не теряя при этом способности к направленной миграции и дифференциации в нервные и глиальные клетки при последующей трансплантации в мозг взрослых крыс [22].

При асимметричном митозе стволовые клетки генерируют дочерние клетки, так называемые клетки-предшественники, с ограниченными пролиферативными потенциалами. При дифференцировке клеток-предшественников дают начало дефинитивным соматическим клеткам. Возможно, *in vivo* мультипотентные клетки-предшественники, в отличие от стволовых клеток, обладают меньшими пролиферативными потенциалами и число их делений ограничено [24].

В связи с поисками новых путей решения проблемы заместительной терапии с использованием стволовых клеток и клеток-предшественников внимание биологов и клиницистов привлекла способность этих клеток давать начало специализированным соматическим клеткам различных типов под влиянием ряда индуцирующих ростовых факторов и сохранять эту способность после длительной криоконсервации.

В 1998 г. Д. Томсон (США) впервые получил клеточные линии эмбриональных стволовых клеток человека из 4—5-дневной бластоцисты [62]. Источником эмбриональных стволовых клеток послужили предимплантационные зародыши, остающиеся невостребованными при экстракорпоральном оплодотворении. Эмбриональные стволовые клетки сохраняли высокий темп клеточного деления и тотальную плюрипотентность (способность дифференцироваться в любую из специализированных линий — производных экто-, мезо- и энтодермы). В том же году Д. Герхарт и сотр. (США) получили клеточные линии половых прогениторных клеток из полового зачатка 4—5-недельного плода [56].

В 1999 г. журнал "Science" признал открытие стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и осуществления программы "Геном человека". Открытие стволовых клеток ведет к самому простому и экономичному способу долго-

срочного макромасштабного выращивания специализированных клеток человека. Ранее выращивание клеток человека в двухмерной первичной культуре на пластике всегда вело к необратимой дифференцировке и утрате полезных функций гепатоцитами, нейронами, мышечными и клетками других типов [33]. Только недавно было установлено, что соматические клетки человека стабильно сохраняют фенотип при плотности 10^9 клеток/мл и при наличии ядра из мезенхимных клеток. Такое устройство функциональных единиц органа можно получить лишь из стволовых клеток, рекапитулируя эмбриогенез органа.

Потенции стволовых клеток к неограниченной пролиферации и вторичной дифференцировке в культуре только начинают использовать для создания нового "биосырья" для трансплантации взамен донорских органов и фетальной ткани. Широкие возможности применения клонов эмбриональных стволовых клеток для клеточной заместительной и генной терапии были положительно оценены в США, Англии, Германии, Японии и ряде других стран. В США существовал запрет на государственную поддержку работ по выделению стволовых клеток из эмбрионов человека, недавно работа с линиями таких клеток разрешена. Ряд частных лабораторий и биотехнологических компаний включились в разработку методов получения и терапевтического использования стволовых клеток. Биотехнологические компании в конце XX века получили более 2500 патентов на новые технологии и манипуляции с эмбриональными стволовыми клетками. Большинство из них до недавнего времени были недоступны в открытой печати по коммерческим соображениям и из-за действующих правительственных ограничений (например, запрет в США на получение межвидовых бластоцист-гибридов).

В 2000 г. закончились первые клинические испытания по безопасной пересадке лабораторных нейробластов, полученных из эмбриональных стволовых клеток тератокарциномы NTera-2 человека. Нейробласты (10—12 млн) вводили в базальное ядро мозга пациента через 6 мес после геморагического инсульта. У половины пациентов достоверно улучшалась моторная симптоматика через 6—12 мес после пересадки [41]. Одновременно с положительными клиническими сдвигами отмечено улучшение кровоснабжения зоны инсульта после трансплантации клеток [43]. Сходные клинические испытания эффективности клеточных биотрансплантатов у пациентов после инсульта проходят одновременно в 5 клиниках США и Европы.

Согласно современным представлениям физиологическая регенерация тканей взрослого организма и их репарация в случае повреждения осуществляются при непосредственном участии стволовых клеток взрослого организма. Мультипотентные стволовые клетки в настоящее время обнаружены во многих тканях взрослого организма, включая головной мозг, костный мозг, мышечную ткань, поджелудочную железу, печень, жировую ткань, кровь и др. [42]. В таблице собраны данные об основных типах стволовых клеток взрослого организма, места их локализации, дифференцировочных потенциалах и примерах клинического использования.

Большая часть стволовых клеток взрослого организма содержится в костном мозге. Более 40 лет назад было показано, что костный мозг содержит два типа стволовых клеток: гемопоэтические стволовые клетки (из которых формируются клетки крови всех типов) и стромальные

Стволовые клетки взрослого организма: локализация, дифференцировка и применение

| Тип клеток | Локализация | Продукты дифференцировки | Клиническое использование |
|--|--|--|---|
| Гемопозитические стволовые клетки | Костный мозг, периферическая кровь | Гемопозитические клетки крови (эритроциты, лимфоциты, моноциты, гранулоциты, макрофаги, тромбоциты), астроциты, нейроны, эпителиальные клетки, холангиоциты, гепатоциты | Лейкемия, лимфогранулематоз, апластическая анемия, талассемия, глобидноклеточная лейкодистрофия, остеопериостит и др. |
| Мезенхимные или стромальные стволовые клетки | Костный мозг, периферическая кровь, кровь пуповины (плацента), жировая ткань | Адиipoциты, хондроциты, теноциты, остеобласты, остеоциты, миоциты, кардиомиоциты, миофибробласты, нейроны, клетки нейроглии, а также гепатоциты и эндотелиальные клетки, клетки поджелудочной железы | Аутоиммунные заболевания (диабет, ревматоидный артрит, красная волчанка, сухой кератоконъюнктивит), сердечно-сосудистые заболевания (инфаркт миокарда, ишемия сердца), миопатия Дюшенна и др. |
| Нейрональные стволовые клетки | Гиппокамп, обонятельная луковица, спинной мозг, лимб роговицы и сетчатка глаза | Нейроны, клетки нейроглии, гемопозитические клетки крови, скелетно-мышечные клетки | Болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, инсульт, ишемия и др. |
| Стволовые клетки печени | Канальцы Геринга | Гепатоциты, холангиоциты, овальные клетки, клетки желчных протоков, клетки кишечного эпителия, клетки поджелудочной железы, нейроны и кардиомиоциты | Цирроз печени, гепатиты, панкреатиты, сердечно-сосудистые заболевания и др. |
| Стволовые клетки поджелудочной железы | Поджелудочная железа | Альфа-, бета- и дельта-клетки поджелудочной железы, гепатоциты | Диабет I типа, хронический панкреатит, карцинома поджелудочной железы и др. |
| Скелетно-мышечные стволовые клетки | Скелетные мышцы | Остеобласты, остеоциты, миоциты, гемопозитические клетки крови | Травмы опорно-двигательного аппарата, сложные переломы костей, остеопороз, остеоартроз и др. |
| Стволовые клетки кожи | Базальный слой эпидермиса, волосяные фолликулы | Кератиноциты, фибробласты, клетки волосяных фолликул, адиipoциты, миоциты, нейроны | Ожоги разной степени тяжести, облысение, нейродегенеративные заболевания |
| Эпителиальные стволовые клетки легких | Трахеальные базальные и слизеобразующие клетки, бронхиолярные клетки Клара | Слизистые клетки, реснитчатые клетки, пневмоциты I и II типа | Заболевания воздушно-дыхательных путей |
| Эпителиальные стволовые клетки кишечника | Основания крипт | Энтероциты, клетки Давыдова, слизеобразующие бокаловидные клетки, энтероэндокринные клетки | Заболевания желудочно-кишечного тракта |

стволовые клетки (из которых формируются клетки костей, сухожилий и других соединительных тканей) [23].

Гемопозитические стволовые клетки в настоящее время хорошо изучены и пути их превращения в клетки крови давно известны. Особого внимания заслуживают терапевтические возможности мезенхимных стволовых клеток взрослого организма, способных дифференцироваться в клетки практически любой ткани взрослого организма.

Многие специалисты склоняются к мнению, что стромальная основа всех органов и тканей млекопитающих и человека возникает из общего пула мезенхимных стволовых клеток уже на стадии органогенеза. Показан огромный потенциал мезенхимных стволовых клеток, способных дифференцироваться в специализированные клетки органов всех зародышевых листков [38]. Во взрослом организме основная часть мезенхимных стволовых клеток сохраняется в стромах рыхлой соединительной и костной ткани. Поэтому костномозговая ткань человека и млекопитающих остается предпочтительным источником извлечения мезенхимных стволовых клеток. Сеть стромальных клеток

заполняет пространство между капиллярами (синусоидами) и костью. Доля истинных "покоящихся" мезенхимных стволовых клеток в костном мозге взрослого человека не превышает 0,01—0,001%, то есть сопоставима с таковой гематогенных стволовых клеток [17].

Одной из основных преград, ограничивающих клиническое использование стволовых клеток, является иммунное отторжение. Среди возможных решений данной проблемы — использование молекул, маскирующих белки, которые ответственны за совместимость тканей [20]. Данный подход использован при пересадке клеток свиньи больному болезнью Паркинсона [52].

Известно, что "гнезда" стромальных клеток, содержащих стволовые региональные клетки, являются мощным иммунологическим барьером, защищающим стволовые клетки от бактерий, вирусов и чужеродных антигенов. Например, клетки Сертоли, и после рождения окружающие мужские прогениторные половые клетки, нашли оригинальное применение в экспериментальной неврологии [10]. Их смешивают с нейрональными стволовыми клетка-

ми при трансплантации. Выживание нервных стволовых клеток в паре с клетками Сертоли возрастает в несколько раз за счет трофических и барьерных функций герментативной стромы.

С другой стороны, имплантация и репопуляция аллогенных мезенхимных стволовых клеток сопряжены с низкой иммунной реакцией и локальным воспалением. Низкая антигенная активность мезенхимных стволовых клеток связана не только с отсутствием экспрессированных комплексов гистосовместимости, но и с наличием целого ряда иммуносупрессорных белков [7]. Эти характеристики определяют терапевтические возможности мезенхимных стволовых клеток как нового биосырья для тканевой регенерации, имеющей огромные перспективы в медицине ближайшего будущего.

Пересадка мезенхимных стволовых клеток используется для лечения врожденной хрупкости костей, вызванной дисбалансом остеобластов и остеокластов в костной ткани [34]. Ростки донорской костной ткани восстанавливают утраченный баланс обновления реципиентной костной ткани за счет "химеризации" пула стволовых клеток в костной ткани реципиента. Донорские клетки пересаживают на трехмерном керамическом или протеогликановом матриксе с множественными полостями (типа губки). Проходят первые клинические испытания культуры мезенхимных прогениторных клеток в лечении сложных переломов кости, когда возможности регенерации кости ограничены [40]. Собственные и аллогенные мезенхимные клетки применяют для создания "искусственного хряща" в культуре с целью подсадки и коррекции дефектов суставного хряща после травмы или аутоиммунных поражений [61]. С 2001 г. показанная экспериментально на животных способность взрослых гемопоэтических и стромальных клеток костного мозга человека дифференцироваться в кардиомиоциты и гладкомышечные клетки используется в регенеративной кардиологии [27, 58].

Эти и другие наблюдения дали толчок к развитию медуко-биологических исследований, направленных на изучение возможности использования стволовых клеток для клеточной терапии многих известных приобретенных и наследственных заболеваний. Аллогенные и аутогенные пересадки стволовых клеток применяют для лечения множественной миеломы, апластической анемии и спонтанной цитопении — заболеваний с первичным дефектом стромы в гематогенной ткани [42]. Внутримозговая трансплантация нативных и генетически модифицированных стволовых клеток используется в клеточной и генной терапии некоторых форм патологии мозга, включая болезни Паркинсона, Гентингтона и Альцгеймера, рассеянный склероз, инсульт и ишемию [59]. К трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток прибегают при некоторых гематологических заболеваниях, в частности при врожденных нарушениях иммунной системы, наследственных анемиях, некоторых болезнях обмена и злокачественных гематологических заболеваниях [42]. Экспериментальные и пока немногочисленные клинические наблюдения показали высокую эффективность клеточной терапии стволовыми клетками в случае инфаркта миокарда и при травмах опорно-двигательного аппарата. Нельзя забывать о применении стволовых клеток и в комплексной терапии злокачественных новообразований.

В настоящее время постоянно разрабатывают новые клеточные технологии на основе использования стволовых клеток и расширяют области их клинического применения. Важно обратить внимание на то, что выделение стволовых клеток и получение долгоживущих клонов этих клеток, их культивирование *in vitro* позволило выявить факторы направленной дифференциации клеток и показать возможность использования нативных и генетически модифицированных стволовых клеток для трансплантации с целью клеточной и генной терапии при различных патологиях тканей организма.

Биореакторы — основа автоматизации процессов культивирования клеток

Непременным условием клеточных технологий является накопление *in vitro* функционально активных клеток пациента за достаточно короткий период времени, определяемый эффективностью выбранной тактики лечения.

Один из возможных путей решения поставленной проблемы заключается в создании автоматизированных биореакторов, в которых используются достижения современной биологии, электроники, информатики и других областей знаний [54].

Использование биореакторов позволяет получать большой клеточный объем в сравнении с обычными техниками культивирования. Контроль за потоками внутри биореакторов позволяет увеличить массоперенос питательных веществ, газов, метаболитов, регуляторных факторов, что позволяет регулировать объем и структуру формирующейся ткани. Наряду с этим биореакторы обеспечивают механические регуляторные сигналы для стимуляции биосинтеза клетками специфических молекул. Например, при культивировании клеток хряща в трехмерных полимерных каркасах в биореакторе с перемешиванием поток жидкости внутрь реактора увеличивал массоперенос питательных веществ и отходов, в результате чего образцы ткани были на 30% толще, чем при культивировании в обычных условиях [67]. Кроме этого, перемешивание оказывало гидродинамическое воздействие на клетки, увеличивая количество необходимых биологических компонентов, таких как гликозаминогликаны и коллаген (на 60% и 125% соответственно), что улучшало биохимические свойства получаемой ткани (хряща).

Л. Никласон и сотр. показали улучшение механических свойств создаваемых искусственно кровеносных сосудов при подаче пульсирующего потока питательной среды в сравнении с таковыми ткани, растущей в стационарных условиях [50]. Данный метод использовали при конструировании принципиально новых клапанов сердца [32]. Мезенхимные стволовые клетки помещали на полимер, выполненный в форме трехстворчатого клапана, и в дальнейшем культивировали в биореакторе в режиме "пульсирующего потока". Клетки, проявившие высокую жизнеспособность, формировали гомогенную тканевую поверхность, синтезировали коллаген, эластин, виметин и катинмиозиновые нити. Основное направление дифференцировки — миофибробласты. Все клапаны синхронно открывались и закрывались. Биохимические свойства были схожими с таковыми натуральных клапанов. Такие биоинженерные клапаны должны прийти на смену широко применяемым в настоящее время механическим клапанам.

Особенно перспективным является создание автоматизированных портативных систем культивирования клеток. Среди преимуществ данных систем можно выделить возможность автоматизированного управления физико-химическими параметрами среды культивирования и их малые габариты [3]. Изменение физико-химических параметров культивирования приводит к изменению не только количественного, но и качественного состава продуктов биосинтеза, в результате чего могут быть получены совершенно новые соединения с принципиально другим типом действия.

Следует отметить, что среди известных технических решений аппаратного обеспечения процессов культивирования клеток в условия *in vitro* наиболее перспективными являются технологии, основанные на использовании полых волоконных трубок. Картриджи на полых волоконных трубках используют при создании искусственных почек [36] и искусственной печени [28, 29]. В биотехнологиях получения ценных биологических веществ и агентов также предложено использовать картриджи на полых волоконных трубках [18, 55].

В результате научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ в области клеточной биотехнологии и клеточной инженерии, проводимых в течение ряда лет на кафедре биофизики Белгосуниверситета, была разработана портативная автоматизированная биореакторная система для культивирования клеток, в которой использованы картриджи на полых волоконистых трубках (рис. 2). Система предназначена для автоматизации наукоемких технологий культивирования клеток, наработки большого количества функционально активных клеток в условиях *in vitro*, получения новых биологически активных веществ.

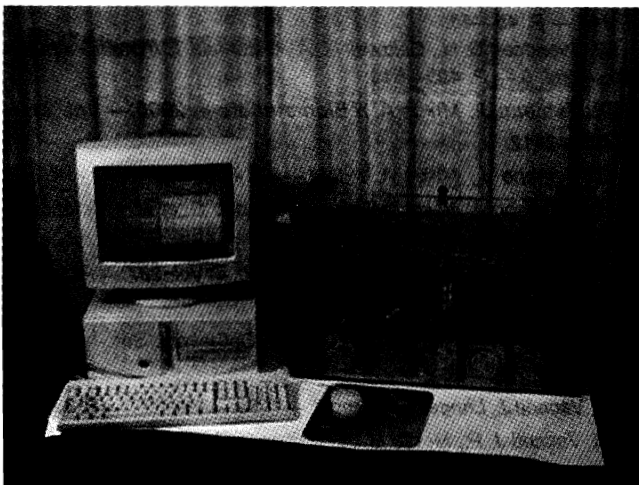


Рис. 2. Общий вид биореакторной системы

Управление аппаратными средствами разработанной системы, общий вид которой представлен на рис. 2, осуществляется с помощью специально разработанного программного обеспечения, в котором учтены особенности технических параметров картриджа и электрических схем, используемых в системе. С помощью программного обеспечения устанавливаются режим культивирования клеток (температура, pH, скорость циркуляции, парциальное да-

вление кислорода и углекислого газа, время культивирования, подача факторов роста).

В системе использованы собственные варианты конструкций датчиков pH и pO_2 , параметры которых занесены в базу данных системы. Программное обеспечение системы разработано с учетом результатов экспериментальных исследований всех узлов системы, в процессе которых изучались вопросы управления физико-химическими условиями культивирования [1, 2]. При запуске и отладке системы использованы картриджи типа PNF-4025-20 (фирма "CELLMAX", США).

Разработанная система может использоваться как при отработке технологий культивирования клеток различных типов, так и в биотехнологическом производстве биологически активных веществ и клеточных вакцин.

Таким образом, создание автоматизированных портативных систем культивирования клеток, успешное внедрение в практику экспериментальной биологии методов длительного культивирования стволовых клеток и клеточных предшественников различных тканей животных и человека, выделенных из эмбрионов, плодов и взрослых организмов, определяют научно-техническую базу для разработки технологий заместительной клеточной и тканевой терапии.

В настоящее время разработаны клеточные технологии лечения болезней сосудов сердца и головного мозга, инфаркта, сердечной недостаточности, церебрального паралича, заболеваний крови (в том числе анемии, связанные с заболеваниями желудочно-кишечного тракта), аллергических, онкологических, инфекционных заболеваний, аутоиммунных и иммунодефицитных состояний, диабета, вегетососудистой и нейроциркуляторной дистонии, бесплодия у мужчин и женщин, синдрома хронической усталости, а также для повышения жизненного тонуса, реабилитации памяти, продления жизни, кардинального улучшения ее качества, включая восстановление внешнего вида пациента.

Дальнейшее развитие фундаментальных исследований механизмов клеточной дифференцировки и регенерации тканей, создание принципиально новых и эффективных биомедицинских технологий клеточной и генной терапии помогут решить проблему лечения ряда тяжелых заболеваний человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лисиченок А. Н., Лобан В. А., Дралеза А. И., Лыньков Л. М. // Средства медицинской электроники и новые медицинские технологии: Материалы междунар. науч.-технич. конф.— Минск, 2002.— С. 81—84.
2. Мартинович Г. Г., Паркун И. В., Лобан В. А. и др. // Там же.— С. 84—87.
3. Черенкович С. Н., Дралеза А. И., Лобан В. А. // Там же.— С. 19—22.
4. Aebischer P., Winn S., Galletti P. // *Brain Res.*— 1988.— Vol. 448.— P.364—368.
5. Anderegg C., Metzger D., Nicoll B. // *J. Periodontol.*— 1995.— Vol. 6.— P. 397—402.
6. Bell E., Ehrlich P., Buttle D., Nakatsuji T. // *Science.*— 1981.— Vol. 221.— P.1052—1054.
7. Bianco P., Robey P. // *J. Clin. Invest.*— 2000.— Vol. 105.— P. 1663—1668.

8. Bisceglie V. // *Ztschr. Krebsforsch.*— 1933.— Bd 40.— S. 122—140.
9. Bonassar L., Vacanti C. // *J. Cell. Biochem.*— 1998.— Suppl. 30/31.— P. 297—303.
10. Borlongan C. // *Exp. Opin. Investig. Drugs.*— 2000.— Vol. 9.— P. 2319—2330.
11. Burg K., Porter S., Kellam J. // *Biomaterials.*— 2000.— Vol. 21.— P. 2347—2359.
12. Burke J., Yannas I., Quimby W. et al. // *Ann. Surg.*— 1981.— Vol. 194.— P. 413—448.
13. Cao Y., Vacanti J., Ma X. et al. // *Transplant. Proc.*— 1995.— Vol. 26.— P. 3390—3392.
14. Chang P., Lee S., Huang J. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*— 1995.— Vol. 36.— P. 1467—1476.
15. Chick W., Like A., Lauris V. // *Science.*— 1975.— Vol. 187.— P. 847—848.
16. Cima L., Vacanti J., Vacanti C. et al. // *J. Biomed. Eng.*— 1991.— Vol. 113.— P. 143—151.
17. Deans R., Moseley A. // *Exp. Hematol.*— 2000.— Vol. 28.— P. 875—884.
18. Evans T., Miller R. // *BioTechniques.*— 1988.— Vol. 6.— P. 762—767.
19. Fabiani J., Dreyfus G., Marchand M. et al. // *Ann. Thorac. Surg.*— 1995.— Vol. 60.— P. 189—194.
20. Faustman D., Coe C. // *Science.*— 1991.— Vol. 252.— P. 1700—1702.
21. Francis S. J.-K., Matthew H. // *Biomaterials.*— 2000.— Vol. 21.— P. 2589—2598.
22. Fricker R., Carpenter M., Winkler C. et al. // *J. Neurosci.*— 1999.— Vol. 19.— P. 5990—6005.
23. Friedenstein A., Petrakova K., Kurolesova A., Frolova G. // *Transplantation.*— 1968.— Vol. 6.— P. 230—247.
24. Gage F. // *Science.*— 2000.— Vol. 287.— P. 1433—1438.
25. Griffith L. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 2002.— Vol. 961.— P. 83—95.
26. Guenard V., Kleitman N., Morrissey T. et al. // *J. Neurosci.*— 1992.— Vol. 2.— P. 3310—3320.
27. Hamano K., Li T., Kobayashi T., Hirata K. et al. // *Ann. Thorac. Surg.*— 2002.— Vol. 73.— P. 1210—1215.
28. Hay P., Veitch A., Smith M. et al. // *Artif. Organs.*— 2000.— Vol. 24.— P. 278—288.
29. Hay P., Veitch A., Gaylor J. // *Artif. Organs.*— 2001.— Vol. 25.— P. 119—130.
30. Heng L. // *Biomaterials.*— 1998.— Vol. 19.— P. 1419—1423.
31. Hern D., Hubbell J. // *J. Biomed. Mater. Res.*— 1998.— Vol. 39.— P. 266—276.
32. Hoerstrup S., Kadner A., Melnitchouk S. et al. // *Circulation.*— 2002.— Vol. 106.— P. 1143—1150.
33. Horster M. // *Klin. Wochenschr.*— 1980.— Bd 58.— S. 965—973.
34. Horwitz E., Prockop D., Fitzpatrick L. et al. // *Nat. Med.*— 1999.— Vol. 5.— P. 309—313.
35. Huang D., Chang T., Aggarwal A. et al. // *Ann. Biomed. Eng.*— 1993.— Vol. 21.— P. 289—305.
36. Humes H., MacKay S., Funke A., Buffington D. // *Kidney Int.*— 1999.— Vol. 55.— P. 2502—2514.
37. Jauregui H., Gann K. // *J. Cell. Biochem.*— 1991.— Vol. 45.— P. 359—365.
38. Jiang Y., Yahagirdar B., Reinhardt R. et al. // *Nature.*— 2002.— Vol. 418.— P. 41—49.
39. Kempczinski R., Rosenman J., Pearce W. et al. // *J. Vasc. Surg.*— 1985.— Vol. 2.— P. 424—429.
40. Koller M., Palsson M., Manchel I. et al. // *Biomaterials.*— 1998.— Vol. 19.— P. 1963—1972.
41. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. et al. // *Neurol.*— 2000.— Vol. 55.— P. 565—569.
42. Korbling M., Estrov Z. // *N. Engl. J. Med.*— 2003.— Vol. 349.— P. 570—582.
43. Krebsbach P., Kuznetsov S., Bianco P., Robey P. // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*— 1999.— Vol. 10.— P. 165—181.
44. Langer R., Vacanti J. P. // *Science.*— 1993.— Vol. 260.— P. 920—926.
45. Lanza R. P., Ecker D., Kuhlreiber W. et al. // *Transplant. Proc.*— 1995.— Vol. 27.— P. 3322.
46. LeBaron R., Athanasiasu K. // *Biomaterials.*— 2000.— Vol. 21.— P. 2575—2587.
47. Lu L., Yaszemski M., Mikos A. // *Biomaterials.*— 2001.— Vol. 22.— P. 3345—3355.
48. Nakahara H., Goldberg V., Caplan A. // *Clin. Orthop.*— 1992.— Vol. 276.— P. 291—298.
49. Nakashima M. // *J. Dent Res.*— 1994.— Vol. 73.— P. 1515—1522.
50. Niklason L., Gao J., Abbott W. et al. // *Science.*— 1999.— Vol. 284.— P. 489—493.
51. Nishi O., Nishi K., Mano C. et al. // *Ophthalmic. Surg. Lasers.*— 1998.— Vol. 29.— P. 119—125.
52. Pakzaban P., Deacon T. W., Burns L. H. et al. // *Neuroscience.*— 1995.— Vol. 65.— P. 983—996.
53. Parenteau N. L., Hardin-Young J. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 2002.— Vol. 961.— P. 27—39.
54. Ratcliffe A., Niklason L. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 2002.— Vol. 961.— P. 210—215.
55. Rosenberg J., Sorenson J., Veeramallu U., Gebhard T. // *Am. Biotech. Lab.*— 1990.— Vol. 8.— P. 34—39.
56. Shambloft M., Axelman J., Wang S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1998.— Vol. 95.— P. 13726—13731.
57. Sipe J. D. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 2002.— Vol. 961.— P. 1—9.
58. Stamm C., Westphal B., Kleine H. R. et al. // *Lancet.*— 2003.— Vol. 361.— P. 45—46.
59. Svendsen C. N., Caldwell M. A., Ostenfeld T. // *Brain Pathol.*— 1999.— Vol. 9.— P. 499—513.
60. Temeno J., Mikos A. // *Biomaterials.*— 2000.— Vol. 21.— P. 2405—2412.
61. Temeno J., Mikos A. // *Ibid.*— P. 431—440.
62. Thomson J., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. et al. // *Science.*— 1998.— Vol. 282.— P. 1145—1147.
63. Watt N., Hogan B. // *Science.*— 2000.— Vol. 287.— P. 1427—1430.
64. Wolter J., Meyer R. // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*— 1984.— Vol. 82.— P. 187—202.
65. Vacanti J., Langer R. // *Lancet.*— 1999.— Vol. 354.— P. 32—34.
66. Vacanti J. P., Morse M. A., Saltzman W. N. et al. // *J. Pediatr. Surg.*— 1988.— Vol. 23.— P. 3—9.
67. Vunjak-Novakovic G., Freed L., Biron R. J., Langer R. // *Am. Inst. Chem. Engl. J.*— 1996.— Vol. 42.— P. 850—860.