第15卷 第2,3期 广东有色金属学报 Vol. 15, No. 2,3
2005年9月 JOURNAL OF GUANGDONG NON-FERROUS METALS Sep 2005

Article ID: 1003-7837(2005)02,03-0053-07

Разработка и исследование биоискусственных органов и тканей на основе биополимерных материалов

Севастьянов В. И.

(Центр по исследованию биоматериалов, Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов, 123182, г. Москва, Россия)

Число различных пересадок органов и тканей, проводимых в мире в год, достигло 40 тысяч, и в ближайшие десятилетия будет составлять 50% всех операций. В развитых странах на 1 млн. пациентов—500 человек имеют возможность находиться на гемодиализе, 40-проводят трансплантацию почки, 12-ти больцым пересаживают другие внутренние органы.

Потребность в трансплантации почки в России составляет не менее 10 000 человек ежегодно, в то время как в год пересаживается около 500 почек, из них 350-в Москве. Пересадку сердца ожидает около 5000 человек, а эту операцию выполняют только в НИИ трансплантологии и искусственных органов от 10 до 20 в год, практически не решена проблема пересадки органов детям.

Однако этот путь не является кардинальным не только из-за риска отторжения трансплантата и острой нехватки донорских органов, но и в связи с морально-этическими и религиозными проблемами во многих странах мира.

Анализ работ в области трансплантологии и искусственных органов даст основание говорить о появлении принципиально нового подхода к восстановлению функций жизненно важных органов-использование технологий генной, клеточной и тканевой инженерии[1-3]. Так, ежегодный бюджет медицинских центров в Европе, Японии и США, занимающихся проведением фундаментально—прикладных исследований в области тканевой и клеточной инженерии, составляет не менее 1 млн. долларов США, при этом 60%—70% финансирования обеспечивается государством. На 2002 г. в индустрии тканевой инженерии работало 89 компаний из 16 стран с общим расходом средств на сумму 487 млн. долларов. Большая часть-60 компаний, находятся в США, где потенциальный рынок технологий клеточной инженерии, связанных с компенсацией функций утраченных или поврежденных органов, составит около 900 млрд. долларов в год.

В последние годы основной акцент в области биоматериалов сделан на их использовании в генной и клеточной (тканевой) инженерии для разработки биоискусственных (гибридных) органов и тканей[2,3]. Биоискусственные системы должны сочетать в себе свойства живой и неживой ткани таким образом, чтобы, при необходимости, полностью или частично, временно или постоянно заменить функции тех или иных утраченных естественных органов.

Данные системы представляют собой сочетание биостабильного или биодеградируемого матрикса (каркаса, носителя) на основе материалов различной природы и нативных биологических структур (например, биологически активных молекул, факторов роста клеток, белков плазмы крови, клеток различных органов и тканей).

Проводимые исследования можно разделить на две группы[4]:

— разработка имплантируемых матриксов для трансплантации клеток, в том числе, и для создания биоискусственных органов и тканей;

— клонирование клеток органов и тканей из собственных стволовых клеток пациента *in vitro* в специальных биореакторах.

Одним из наиболее перспективных направлений в современной клеточной трансплантологии является разработка и конструирование временных полимерных биодеградируемых двухмерных (пленочных) и трехмерных (губки, гели) матриксов,

Received date: 2005-09-21

万方数据

обладающих необходимыми физико—химическими и медико—биологическими свойствами.

Главным требованием к биодеградируемым матриксам является контролируемое время их биорезорбции в организме с постепенным замещением в строго заданные сроки нативными клетками и тканью того или иного органа. Другими словами, биоискусственный имплантат через определенное время становится полностью биологической 'родной' структурой.

К настоящему времени только четыре биоискусственных системы (все США) разрешены для клинического применения, из которых три-аппликационные (накожные) матриксы с кератоцитами (так называемая искусственная кожа), и только один продукт—имплантируемый матрикс с хондроцитами—для регенерации хрящевой ткани.

Существенным недостатком находящихся на разных стадиях разработки биодеградируемых матриксов является то, что они полностью или частично состоят из синтетических материалов[4] (Таблица 1). Токсичность продуктов распада синтетических или полусинтетических матриц отрицательно влияет на их биологическую безопасность, увеличивает вероятность образования рубцовых тканей и опухолей, что и сдерживает их внедрение в клиническую практику.

Таблица 1 Матрицы для клеточной трансплантации

Матрикс	Природа материала	Состав
DegraPol//btc	Полусинтетическая	композит полиоксиалканоатов с полиуретанами
Neurogel™	Синтетическая	мономеры акриламида и метакриламида
Hyaff	Синтетическая	полиэфируретан
Matrigel	Синтетическая	метакриламид

В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биополимерам и их производным: альгинаты, коллаген, желатин, хитозан, гомо-и сополимеры полилактидов и гликолидов, полиэфиры бактериального происхождения. Многие биополимеры, помимо высокой биосовместимости, являются высокоэффективными биостимуляторами. Они расщепляются на более простые соединения, которые выводятся из организма, либо принимают активное участие в метаболизме на клеточном уровне.

Из биодеградируемых материалов, используемых для изготовления матриксов, было выбрано два биополимера: высокомолекулярный белок животного происхождения-коллаген и бактериальный полимер—сополимер полиоксибутиратоксивалерат.

A. Трехмерный коллагенсодержащий матрикс СфероГЕЛЬ

Коллаген часто используют для изготовления медицинских изделий. Однако из—за его склонности к гидролитической деструкции, коллагеновые имплантаты рассасываются в течение 3—4 недель, что, как и в случае биостабильных синтетических материалов, приводит к формированию рубцовой ткани.

Нами было высказано предположение, что формирование в коллагеновом геле гетерогенной структуры уменьшит скорость биорезорбции материала.

Результатом технологической стадии работы явился выбор оптимальной композиции коллагенсодержащего матрикса, получившего название СфероГЕЛЬ[5].

На Рис 1. представлен общий вид инъекционной формы трехмерного коллагенсодержащего матрикса СфероГЕЛя, устойчивого при длительном хранении и не склонного к расслаиванию. При комнатной температуре матрикс имеет вид прозрачного, слегка опалесцирующего, вязкого, pH сбалансированного геля. Водопоглощение равно 86.6 мас. %,

Сферогель состоит из сфероподобных частиц более сшитого коллагена диаметром (~10—25 мкм), находящихся в гомогенном растворе менее сшитого коллагена (Рис. 2). Размер диффузионных пор матрикса колеблется в пределах 100—300 мкм (Рис 3).

万方数据

Время деструкции Сферогеля в модельных средах, в зависимости от соотношения компонентов матрикса, можно варьировать от нескольких недель до 6 месяцев.

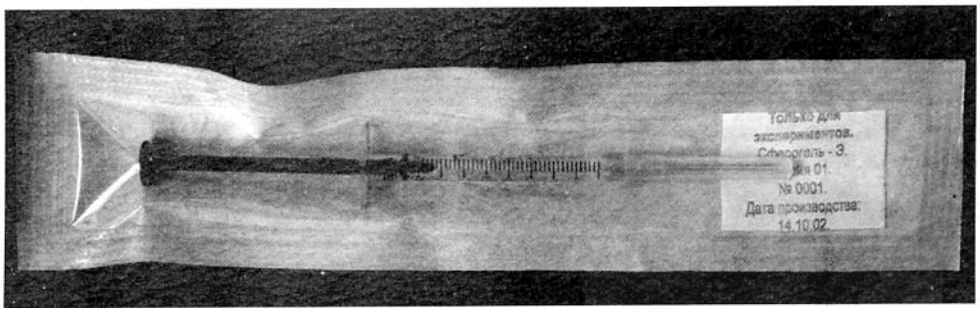

Рис. 1 Общий вид коллагенсодержащего матрикса Сферогеля в инсулиновом шприце

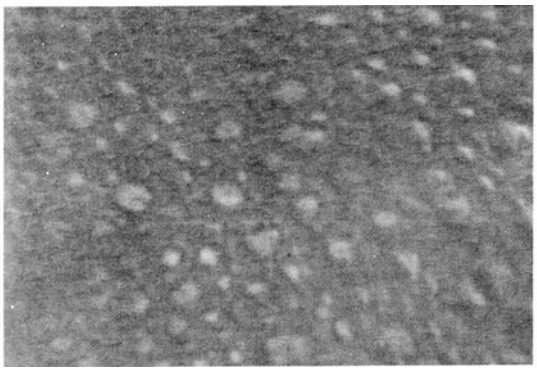

Рис. 2 Микрофотография поверхности матрикса СфероГЕЛЬ (Ув. X 40). Оптический микроскоп (Jenamed 2, Германия)

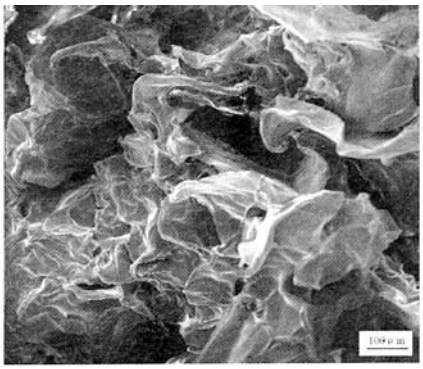

Рис. 3 Микрофотография образца СфероГЕЛя. Сканирующий электронный микроскоп JSM T—330 (Jeol, Япония)

Проведенные эксперименты *in vivo* показали, что гетерогенность коллагена действительно приводит к замедлению скорости биодеструкции матрикса.

На сроке 1 месяц после имплантации Сферогеля в подкожно-жировую клетчатку крысы не обнаружено признаков деструкции образца материала (Рис. 4). На сроке 3 месяца выявлена частичная резорбция геля без признаков клеток воспалительного ряда. Капсула едва различима и состоит из 2—3 слов фибробластов (Рис. 5).

Б. Пленочный матрикс ЭластоПОБ на основе сополимера полиоксибутиратоксивалерат

С конца 80-х годов растет интерес к биодеградируемым полиэфирам бактериального происхождения: полимеру β-оксимасляной кислоты (полиоксибутират, ПОБ), полимеру оксиоктановой кислоты и двухкомпонентным сополимерам β-оксибутирата и β-оксивалерата (ПОБ-со-ПОВ)[6]. ПОБ и его сополимеры синтезируют прокариотические микроорганизмы в специфических условиях. Конечными продуктами биодеградации являются CO_2 и H_2O. Проведенные исследования отечественных ПОБ и ПОБ-со-ПОВ с включением оксивалерата от 4% до 30% мол. в условиях *in vitro* и *in vivo* показали отсутствие

万方数据

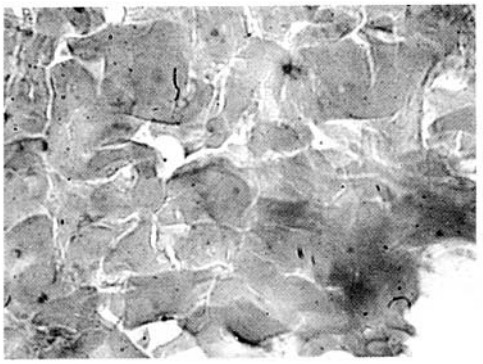

Рис. 4 Гистологическая картина после имплантации Сферогеля в подкожножировую клетчатку крысы на сроке 1 месяц(Ув. X 200)
Окраска гематоксилин-эозином

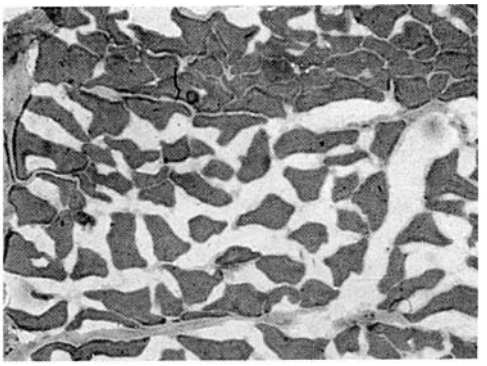

Рис. 5 истологическая картина после имплантации Сферогеля в подкожножировую клетчатку крысы на сроке 3 месяца(Ув. X 200)
Окраска гематоксилин-эозином

цитотоксичности, гемолиза, раздражающего и сенсибилизирующего действия, аллергической реакции немедленного типа и иммунотоксичности[6,7]. Было показано, что очищенные по специальной схеме полимеры обладают не только биосовместимыми, но и гемосовместимыми свойствами[8,9].

Основным компонентом пленочного матрикса был сополимер ПОБ-со-ПОВ с включением оксивалерата 0.5% мол. (Mw = 295 000 — 360 000 Да, кристалличность 50% — 60%), полученный из Института биофизики СО РАН, г. Красноярск. Гидрофобные полимеры, к каким относится ПОБ и его сополимеры, являются неблагоприятной подложкой для прикрепления и пролиферации клеток. Кроме того, к общеизвестным недостаткам пленочных образцов гомополимера и сополимера относится их низкая прочность и плохая эластичность, что существенно ограничивает их применение. Для повышения гидрофильности и эластичности сополимера в его состав был введен высокомолекулярный гидрофильный пластификатор.

Разработанный на основе бактериального сополимера полиоксибутират-оксивалерата биодеградируемый пленочный материал получил название ЭластоПОБ[10].

Как и исходный сополимер ПОБ-со-ПОВ (Рис. 6(a)), ЭластоПОБ имеет ярко выраженную микропористую структуру (Рис. 6(b)) с диаметром пор порядка 0.5 мкм. Значения контактного угол смачивания уменьшились с 85.6±0.6 до 75.2±0.8, а модуль упругости снизился с 3.13 ГПа до 2.65 ГПа по сравнению с образцами из сополимера ПОБ-со-ПОВ. Все исследуемые пленки ЭластоПОБ имели толщину 70±5 мкм.

B. Медико-биологические свойства матриксов СфероГЕЛЬ и ЭластоПОБ

На основании данных исследования медико-биологических свойств разработанного материала в соответствии с межгосударственными стандартами ГОСТ Р ИСО 10993 'Оценка биологического действия медицинских изделий'[11] был сделан вывод о том, что образцы СфероГЕЛя и ЭластоПОБа не обладают местно-раздражающим, сенсибилизирующим и токсическим действием, стерильны, апирогенны, соответствует требованиям, предъявляемым к изделиям для длительного контакта с внутренней средой организма.

万方数据

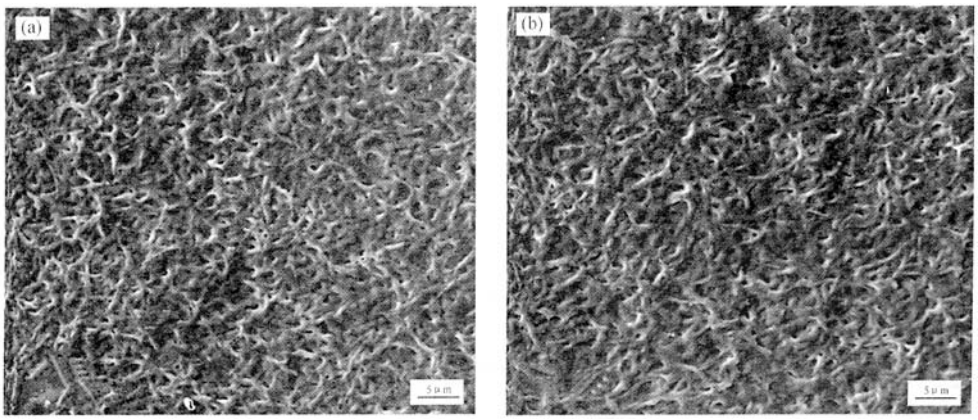

Рис. 6 Структура поверхности образцов. Сканирующая электронная микроскопия (Jeol T—330, Япония): (a)—ПОБ-со-ПОВ; (b)—ЭластоПОБ

Г. Биофункциональные свойства матриксов СфероГЕЛЬ и ЭластоПОБ

Биологическая функциональность Сферогеля и ЭластоПОБа была изучена в экспериментах по культивированию фибробластоподобных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс в условиях *in vitro*, проведенных в лаборатории стволовых клеток НИИ трансплантологии и искусственных органов. Оценивали влияние матрикса на процессы прикрепления и пролиферации клеток. Микрофотография, представленная на Рис. 7, иллюстрирует положительный результат культивирования стволовых клеток на СфероГЕЛе.

Такой же положительный эффект наблюдали и для пленочного материала ЭластоПОБ (Рис. 8).

Результаты культивирования стволовых клеток костного мозга показали, что клетки хорошо прикрепляются и пролиферируют как на поверхности ЭластоПОБ, так и на поверхности ПОБ-со-ПОВ. Клеточный рост сопоставим с ростом на культуральных планшетах из полистирола. Из Рис. 8а видно, что

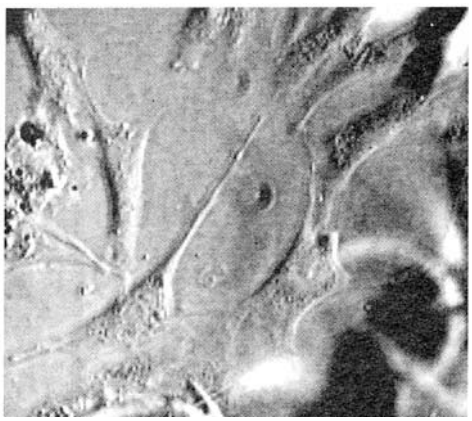

Рис. 7 Фибробластоподобные мезенхимальные клетки костного мозга крысы (Вистар) на поверхности коллагенсодержащего гетерогенного матрикса Сферогель. Время культивирования клеток-7 дней (Ув. X400). Фазово-контрастный микроскоп (Nikon, Япония)

万方数据

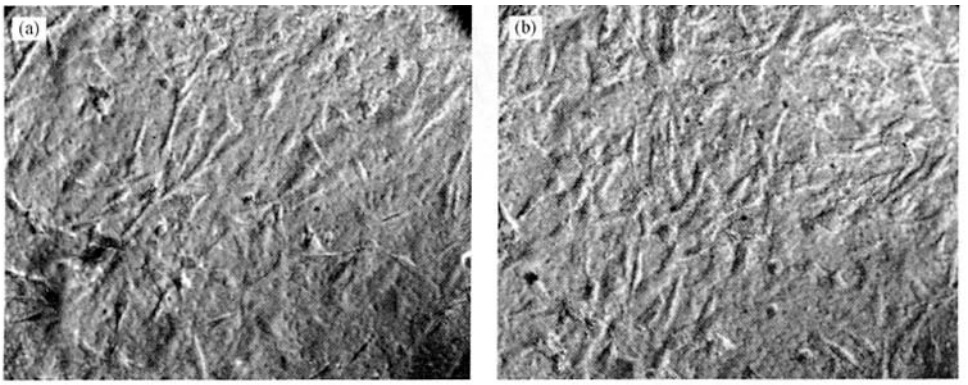

Рис. 8 Фибробластоподобные мезенхимальные клетки костного мозга крысы линии Вистар на поверхности образцов: (a) — ПОБ-со-ПОВ; (b) — ЭластоПОБ. Оптический микроскоп Jenamed 2 (Германия). Ув. X200. Время культивирования 7 дней

на поверхности ЭластоПОБ количество клеток несколько больше, чем на поверхности исходного сополимера ПОБ-со-ПОВ, т. е. ЭластоПОБ в большей степени стимулирует клетки к пролиферации, чем исходный сополимер ПОБ-со-ПОВ.

Клеточный рост на СфероГЕЛе и ЭластоПОБе был сопоставим с ростом клеток на культуральных планшетах из полистирола.

Таким образом, разработанные матриксы Сферогель и ЭластоПОБ обладают следующими физико-механическими, биологическими и функциональными свойствами:

— высокой биосовместимостью как готового материала, так и продуктов его биодеструкции;

— возможностью регулировать время биодеструкции матрикса от нескольких недель до нескольких месяцев;

— способностью к порообразованию непосредственно при контакте с биологическими средами, что способствует процессам неоваскуляризации;

— может выполнять функции каркаса и питательной среды для клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*;

— способностью стимулировать пролиферацию клеток;

— возможность стерилизации без изменения медико-технических свойств;

— продуктами биодеградации матрикса являются углекислый газ и вода.

Полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать СфероГЕЛЬ и ЭластоПОБ в качестве носителя для предварительно культивированных стволовых клеток, и как самостоятельную имплантируемую систему, временно выполняющую функции каркаса и культуральной среды, для трансплантации клеток различной природы и обладающую достаточными биостимулирующими свойствами, чтобы способствовать регенерации клеток в местах повреждения тканей.

Приоритетной областью применения разработанных биодеградируемых композиций является их использование для культивирования стволовых клеток с последующей их имплантацией для клеточной терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы, центральной и периферической нервной системы, опорно-двигательного аппарата, почек, печени и поджелудочной железы.

万方数据

Список литературы

[1] Скалецкий Н. Н., Онищенко Н. А. Клеточная трансплантация: достижения и перспективы. Вестник трансплантологии. № 3—4, 2001, 94—102.

[2] Севастьянов В. И. Новое поколение материалов медицинского назначения. Перспективные материалы, 1997, № 4, 56—60.

[3] Биосовместимость, под ред. В. И. Севастьянова, М., Издательство ГУП《Информационный центр ВНИИГеосистем》, 1999. —усл. печ. л. 23.

[4] Шумаков В. И., Севастьянов В. И. Биополимерные матриксы для искусственных органов и тканей. Здравоохранение и медицинская техника, 2003, №4, 30—32.

[5] Перова Н. В., Порунова Ю. В., Урьяш В. Ф., Фаминская Л. А., Крашенинников М. Е., Расулов М. Ф., Онищенко Н. А., Севастьянов В. И., Шумаков В. И. Биодеградируемый коллагенсодержащий матрикс Сферогель для клеточной трансплантации. Перспективные материалы, 2004, № 2, 52—59.

[6] Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. Полиоксиалканоаты — биоразрушаемые полимеры для медицины (под ред. академик В. И. Шумакова), — Новосибирск. — Изд—во Сибирского отделения РАН. — 2003.

[7] Volova T G, Shishatskaya EI, Sevastianov VI, SN Efremov, O. M Mogilnaya. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. —Biochemical Bioengin. J. —2003. —V. 16, N. 2. —P. 125—133.

[8] В. И. Севастьянов, Н. В. Перова, И. А. Довжик, И. А. Титушкин, Е. А. Немец, З. М. Беломестная, Е. И. Шишацкая, Т. Г. Волова. Медико — биологические свойства полиоксиалканоатов — биодеградируемых бактериальных полимеров. Перспективные материалы. 2001, № 5, стр. 46—55.

[9] Sevastianov V. I., Volova T. G., Perova N. V., Shishatskaya E. I., Kalacheva G. S. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. —J. of Biomater. Sci. Polymer. Edn. —2003. —V. 14, N. 10. —P. 1029—1042.

[10] Севастьянов В. И., Егорова В. А., Немец Е. А., Перова Н. В., Онищенко Н. А. Биодеградируемый биополимерный материал ЭластоПОБ для клеточной трансплантации. Перспективные материалы, 2004, № 3, 35—41.

[11] ГОСТ ИСО 10993. 99 ‘ Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий’, М., 2000.

万方数据