

DOI: 10.15690/vramn.v70.i5.1442

Д.С. Барановский, А.В. Люндуп, В.Д. Паршин

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
Москва, Российская Федерация

Получение функционально-полноценного мерцательного эпителия *in vitro* для тканевой инженерии трахеи

В настоящее время тканеинженерные трансплантаты трахеи не имеют мерцательного эпителия в своем просвете к моменту трансплантации реципиенту, а длительное отсутствие мукоцилиарного клиренса приводит к ухудшению качества жизни пациента в послеоперационном периоде, что диктует необходимость совершенствования методик культивирования мерцательного эпителия в условиях *in vitro*. **Цель исследования:** получить функционально полноценный пересеваемый мерцательный эпителий *in vitro*. **Методы:** в экспериментальном исследовании использовали мерцательный эпителий, выделенный из инцизионного биоптата трахеи человека и культивируемый в специальных условиях с последующей оценкой морфофункциональных характеристик получаемых культур. **Результаты:** получены культуры клеток мерцательного эпителия человека, характеризующиеся наличием активного синхронного пропульсивного мерцания ресничек, функциональные характеристики которого соответствуют таковым в здоровой слизистой оболочке дыхательных путей. Изучены основные параметры их активности. **Заключение:** результаты исследования позволили установить новые особенности культивирования мерцательного эпителия *in vitro*, разработать оптимальный способ получения данной ткани.

Ключевые слова: тканевая инженерия трахеи, мерцательный эпителий трахеи, клеточная культура.

(Для цитирования: Барановский Д.С., Люндуп А.В., Паршин В.Д. Получение функционально-полноценного мерцательного эпителия *in vitro* для тканевой инженерии трахеи. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (5): 561–567. Doi: 10.15690/vramn.v70.i5.1442)

561

Обоснование

Среди всех заболеваний трахеи наибольшее значение в последнее время придают локальным и протяженным рецидивирующим рубцовым стенозам. В последние годы их частота существенно возросла [1]. Предположительно, это связано с увеличением числа тяжелых больных с черепно-мозговой и комбинированной травмой, нуждающихся в проведении реанимационных мероприятий, сопровождающихся искусственной вентиляцией легких, и с увеличением возможностей реанимационно-анестезиологического пособия, позволяющего возвращать к жизни крайне тяжелых пациентов. По некоторым данным, до 79% пациентов, перенесших искусственную вентиляцию легких через интубационную или трахеостомическую

трубку, в последующем имеют стенотические поражения трахеи той или иной степени тяжести [1].

Эта проблема давно занимает внимание врачей, но, несмотря на значительное внимание, уделяемое ей со стороны торакальных хирургов и врачей-эндоскопистов, и большое число клинических исследований, окончательного решения пока не найдено.

Применение современных методов эндоскопической хирургии не позволило полностью решить проблему. Часто вслед за реканализацией рубцово-суженной трахеи и практически полным восстановлением ее проходности развивается рецидив стеноза, а циркулярные резекции трахеи возможны только в том случае, если патологические изменения затрагивают не более 50% длины органа [2].

D.S. Baranovsky, A.V. Lyundup, V.D. Parshin

Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

In vitro Cultivation of Functioning Passaged Ciliated Epithelium for Trachea Tissue Engineering

Background: Currently all tissue engineered trachea transplants had no ciliated epithelium until transplantation, and long-term temporary lack of mucociliary clearance leads to patients' condition decline and reduced life quality in postoperative period. So, the need for a better cultivation method and studying ciliated epithelium growth characteristics in cell culture increased rapidly. **Objective:** The aim of our study was to investigate cultivation of functionally complete passaged ciliated epithelium for trachea tissue engineering. **Methods:** Human ciliated epithelium isolated from intraoperative biopate was used for culturing in the special complex medium with morphological and functional characteristics evaluation. **Results:** Ciliated epithelial cell-groups were obtained by culturing in the special complex medium. Generated cell-groups had ciliary activity and showed well-coordinated movement with functional characteristics similar to native epithelial tissue. The basic parameters of cell-activity were studied. **Conclusion:** Thus our study provides a new insight for the problem of ciliated epithelium *in vitro* culturing as well as developing the optimal laboratory method.

Key words: tracheal tissue engineering, tracheal ciliated epithelium, cell culture.

(For citation: Baranovsky D.S., Lyundup A.V., Parshin V.D. *In vitro* Cultivation of Functioning Passaged Ciliated Epithelium for Trachea Tissue Engineering. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (5): 561–567. Doi: 10.15690/vramn.v70.i5.1442)

Трансплантация трахеи от донора к реципиенту — крайне затруднительная и рискованная процедура в связи с опасностью отторжения трансплантата и необходимостью проведения постоянной интенсивной иммуносупрессии, на фоне которой возрастает риск развития тяжелых инфекционных и онкологических заболеваний органов дыхания.

Тканевая инженерия (ТИ) — одна из новых перспективных биомедицинских технологий, позволяющих индуцировать регенерацию поврежденных тканей, замещать целые органы или их отдельные дефекты биологическими протезами, представляющая альтернативу существующим подходам к лечению. При этом в основе ТИ лежит использование естественной способности организма пациента к восстановлению.

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

В тканевой инженерии трахеи в настоящее время преимущественно используют кадаверные децеллюризованные аллотрансплантаты [3, 4]. Пересадка децеллюризованной трахеи, являясь на сегодняшний день относительно простым и хорошо изученным методом, тем не менее имеет ряд недостатков. С одной стороны, такие матриксы уже содержат необходимые белки и факторы роста для достаточной адгезии, пролиферации и клеточной дифференцировки, что создает готовые условия клеточной ниши для колонизации собственными эндогенными клетками [5]. С другой стороны, препятствием к их использованию является существующий дефицит донорских органов [6]. В большинстве случаев заселение скаффолда производится только мезенхимальными стволовыми клетками. Такой метод представляется наиболее простым и изученным. Однако, как известно, мезенхимальные стволовые клетки имеют ограниченный потенциал к дифференцировке и не могут являться прогениторными клетками эпителия и слизистых оболочек. Таким образом, такой трансплантат еще не имеет мерцательного эпителия в своем просвете ни к моменту трансплантации реципиенту, ни даже через несколько недель после операции.

Исследование биоптатов, полученных из пересаженной кадаверной трахеи, и оценка микрофотографий некоторыми независимыми экспертами показали наличие большого количества грануляционной ткани в зоне анастомозов и стенке тканеинженерного органа и признаков затяжного хронического воспаления с крайне небольшими и незначительными участками, занятыми мерцательным эпителием [7].

По данным одного пятилетнего наблюдения за таким пациентом, покрытие внутренней поверхности трансплантата мерцательным эпителием с восстановлением мукоцилиарного клиренса имело место только через 1 год после трансплантации [8].

Мукоцилиарный клиренс — один из основных механизмов, поддерживающих нормальное функционирование органов дыхательной системы, предотвращающий их колонизацию инфекционными агентами. Длительное временное отсутствие мукоцилиарного клиренса неизбежно приводит к ухудшению состояния и качества жизни пациента в послеоперационном периоде, требует постоянного выполнения повторных санаций бронхиального дерева, увеличивает стоимость его лечения. Фактически, трахея, лишенная активно функционирующей эпителиальной выстилки (мерцательного эпителия), не может считаться полноценным органом.

Создание трахеи с полноценным эпителиальным покрытием потенциально могло бы стать решением существующих проблем, что делает вопрос о разработке методики культивирования мерцательного эпителия *in vitro* в виде диссоциированных клеточных культур с возможностью его переноса на матрикс до пересадки трахеи реципиенту одним из основных в ТИ трахеи сегодня.

Ранее принято было считать, что культивирование мерцательного эпителия *in vitro*, как правило, приводит к росту функционально неполноценных клеток. Они плохо секретируют муцин, склонны к дегенерации и даже полной потере ресничек [9]. Ряд авторов в конце прошлого столетия полагали невозможным полноценное исследование функции клеток мерцательного эпителия *in vitro* именно по этой причине [10]. Позже было показано, что культивирование таких клеток на скаффолдах, содержащих белки естественного межклеточного матрикса (в т.ч. коллаген), с соблюдением условий двухфазной среды позволяет получить функционально полноценный мерцательный эпителий. Существующие методики предполагают также использование специального носителя для создания эффекта «клеточной ниши». Основной их сложностью является необходимость добиться функционального клеточного взаимодействия в рамках скаффолда [11].

Проводились экспериментальные исследования на животных и *in vitro* с самыми различными резорбируемыми и нерезорбируемыми материалами. Многие из них казались достаточно перспективными, однако использование нерезорбируемых материалов чаще всего завершалось неудачей [12, 13].

Культивирование эпителиальных клеток на начальном этапе эксперимента *in vitro* возможно на коллагеновом геле, который стратифицируется на коллагеновой губке, или на специальной коллагеновой пленке, или на базе коллагеновых дисков в двухфазной среде [14–16]. Выявлялось полное покрытие носителя эпителиальными клетками с наличием областей, занятых сформировавшимся мерцательным эпителием (имеющим реснички или микроворсинки). Однако доля таких клеток была все же несколько ниже, чем в нативной ткани носовой раковины [17]. Кроме того, применение подобных носителей технически усложняет методику культивирования, увеличивает ее стоимость. К настоящему моменту показано, что культивирование фибробластов вместе с эпителиальными клетками ускоряет рост, миграцию и дифференцировку последних, стимулирует образование базальной мембраны (между фибробластами и эпителиальными клетками), способствует более раннему появлению мерцательного эпителия и бокаловидных клеток, что, как следствие, приводит к ранней продукции муцина и секреции слизи [17, 18].

Таким образом, все вышеописанные методики представляют собой сложный многоэтапный дорогостоящий процесс, реализация которого возможна только в условиях отдельных экспериментальных исследований. Общим недостатком большинства опубликованных экспериментальных работ можно считать отсутствие объективной оценки двигательной активности цилиарного аппарата или частоты мерцания ресничек, в то время как данный показатель представляется значимым в оценке функциональной полноценности получаемой культуры.

Целью настоящего исследования была оптимизация условий и методики культивирования мерцательного эпителия *in vitro*, разработка наиболее простого и относительно недорогого метода получения клеточных культур, пригодных к заселению матриксов для последующей

трансплантации, разработка наиболее простой и недорогой объективной методики оценки функциональной полноценности получаемой культуры.

Методы

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное исследование.

Критерии соответствия

Критерии включения: в исследовании использовали инцизионные биоптаты трахеи пациентов в возрасте от 18 до 55 лет, давших информированное добровольное согласие на использование их тканей в научно-исследовательских целях.

Критерии невключения: в исследовании не использовали ткани пациентов с диагнозом «Рубцовый стеноз трахеи», опухолевыми или инфекционными заболеваниями органов дыхания.

Клеточный источник

В качестве источника исследуемых клеток использовали инцизионный биоптат трахеи пациентов в возрасте от 18 до 55 лет. В исследовании не участвовали лица младше и старше указанного возраста, беременные, пациенты, которым был поставлен диагноз «Рубцовый стеноз трахеи».

Условия проведения

Исследование проведено на базе отдела биомедицинских исследований НИИ молекулярной медицины, Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Фрагмент трахеи доставляли в лабораторию в герметичном контейнере с транспортной питательной средой «Игла». Дальнейшие действия с образцом проводились в условиях специализированной лаборатории тканевой инженерии, помещении класса «А» с соблюдением всех правил асептики.

Продолжительность исследования

Общая продолжительность исследования составила 15 сут.

Описание эксперимента

Подготовка образцов

Образец трехкратно отмывали в растворе фосфатного буфера (PBS) и однократно — в растворе хлоргексидина биглюконата 0,05% в течение 1 мин. В результате отмывки происходит удаление слизи с внутреннего просвета трахеи, эритроцитов и большей части бактериальных клеток, составляющих микрофлору верхних дыхательных путей. Обработка хлоргексидином представляется значимой для предотвращения бактериальной контаминации последующих клеточных культур в связи с тем, что большинство пациентов, перенесших хирургические операции на трахее, могли ранее длительное время находиться на искусственной вентиляции легких и являться носителями полирезистентной внутрибольничной микрофлоры. Вместе с тем кратковременная обработка хлоргексидином не оказала существенного повреждающего влияния на эпителиальную ткань.

Подготовленный образец трахеи после отмывки приобретает белую или светло-розовую окраску.

Выделение и культивирование эпителиальных клеток

Выделение клеток производили по стандартному протоколу с некоторыми модификациями. Подготовленный образец трахеи с целью проведения изоляции эпите-

лиальных клеток помещали в раствор диспазы в транспортном среде (3 Ед/мл) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После ферментативной обработки образец приобретает белый цвет, а его внутренняя поверхность — рыхлую структуру.

Механическое отделение эпителиальных клеток от базальной мембраны производили в полнокомпонентной питательной среде Eagles в модификации Дульбекко: HAMS-F12 — 50% об/об (DMEM/HAMS-F12; Biochrome, Германия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS; Biochrome, Германия), пенициллина, стрептомицина l-глутамин (PAA Laboratories, Австрия), незаменимых аминокислот, инсулина, трансферрина, селена (Sigma, США), в общей сложности 1% об/об.

Раствор абсорбировали и центрифугировали (1300 об./мин, 5 мин), полученный осадок ресуспендировали в питательной среде Eagles в модификации Дульбекко (см. выше).

Полученную суспензию высевали в 12-луночный планшет. В 6 лунок устанавливали цилиндрические вставки диаметром 5 мм с микропористым дном. К каждой лунке добавляли полнокомпонентную питательную среду Eagles в модификации Дульбекко (см. выше) и ретинола (1000 Ед/мл). Вставки заполняли кондиционированной средой фибробластов линии 3Т3.

В качестве контроля использовали аналогичные лунки без вставок с кондиционированной средой. Промаркированный планшет помещали в инкубатор, где проводилось культивирование в течение 5 сут при 37 °С, 95% влажности и 5% содержании CO₂ с заменой сред каждые 2-е сут.

На 5-е сут производилось снятие всех клеток со дна лунок раствором трипсина 0,25%, ресуспендирование и перемещение клеточной суспензии в новые аналогичные лунки с последующим культивированием в аналогичных условиях в течение 3 сут.

Методы регистрации результатов

Оценку клеточного роста осуществляли методом световой микроскопии с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония). Производили морфологическую идентификацию полученных клеток, оценивали наличие единичных клеток мерцательного эпителия, колоний мерцающих клеток, синхронность и асинхронность биения ресничек, частоту их мерцания. С целью верификации синхронности и асинхронности колебательных движений, а также подсчета частоты мерцания ресничек выполняли высокоскоростную видеозапись колебательных движений (420 кадров/с) с помощью фото/видеокамеры Apple DNL 432 MKL A8 (Китай), позволяющей различить при просмотре отдельные маятникообразные движения с последующей их интерпретацией. Регистрировали частоту колебательных движений ресничек клеток мерцательного эпителия, расположенных на периферии колонии в многослойных первичных группах (ввиду технической невозможности визуализации движения ресничек над поверхностью многослойной колонии) и частоту колебательных движений ресничек всех клеток мерцательного эпителия в однослойных колониях различного размера.

Этическая экспертиза

Лица, биоптаты трахеи которых использовали в исследовании, предварительно дали на это информированное добровольное согласие.

Статистический анализ

Статистическую оценку частоты мерцания ресничек клеток в колониях мерцательного эпителия произво-

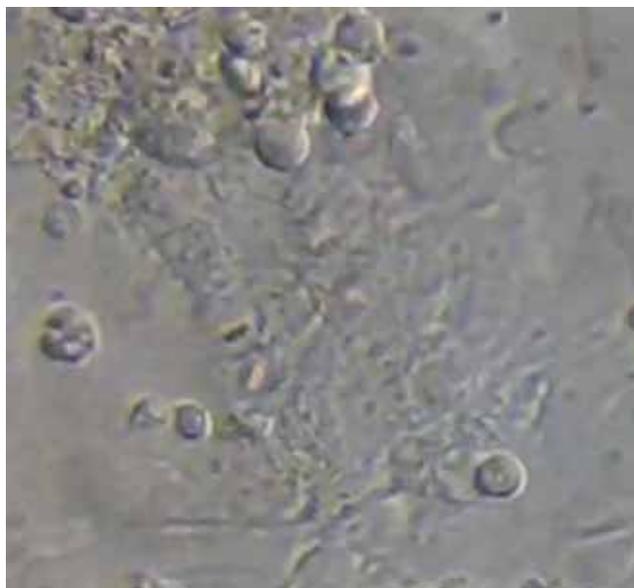


Рис. 1. Монослойные колонии клеток мерцательного эпителия трахеи человека в культуре. Ув. 200.

Примечание. На фотографии видны пучки ресничек на апикальной поверхности эпителиальных клеток в виде черных точек.



Рис. 2. Единичные многослойные группы клеток мерцательного эпителия в первичной культуре

Примечание. На фотографии вокруг колонии видны пучки ресничек на поверхности эпителиальных клеток в виде ореола. Ув. 200.

564

дили при помощи расчета показателей вариационного ряда и критерия Стьюдента в программном обеспечении Microsoft Excel 2013.

Результаты

Клеточная культура

Объектом исследования являлись культуры клеток мерцательного эпителия, выделенного из инцизионного биоптата трахеи человека.

Основные результаты исследования

При морфологической микроскопической оценке на 5-е сут культивирования во всех лунках обнаружались клеточные культуры, представленные преимущественно фиксированными монослойными колониями клеток мерцательного эпителия и единичными первичными многослойными группами клеток (рис. 1, 2). В окружающем колонии монослое преобладали эпителиальные клетки без ресничек и фибробласты, однако отмечалось и наличие единичных мерцающих клеток. В течение последующих пяти суток наблюдался рост колоний мерцательного эпи-

телиа с тенденцией к слиянию. При анализе высокоскоростной видеозаписи в крупных колониях зафиксировано синхронное пропульсивное биение ресничек с возможностью продвижения по поверхности колонии микроскопических инородных тел, в то время как в мелких клеточных группах (около 10–15 клеток) движение ресничек, как правило, оказывалось асинхронным. Частота мерцания ресничек в крупных колониях составляла 10,16 (10,2±1,4) колебаний в секунду и оставалась стабильной на протяжении всего периода культивирования. Единичные, изолированно расположенные клетки значимо ($p = 0,050$) отличались по частоте колебаний ресничек, как правило, значительно более низкой, сильно варьирующей (от 2 до 9 колебаний в секунду, средняя величина 4,25). Сравнительные значения частоты колебательных движений ресничек мерцательного эпителия приведены в табл.

Контрольные лунки характеризовались значительно большим числом фибробластов в монослое, отличались более высокими темпами роста фибробластов и меньшими темпами роста колоний мерцательного эпителия.

При снятии клеточной культуры с последующим ресуспендированием и переносом клеточной суспензии в новые лунки в течение последующих 3 сут отмечалось

Таблица. Сравнительные функциональные характеристики мерцательного эпителия дыхательных путей человека

Характеристика колонии	Частота колебаний ресничек/с (Гц)	Источник
Нормальный мерцательный эпителий в биоптате нативной здоровой ткани	10–11	[19]
Мерцательный эпителий в биоптате при моделировании воспаления <i>in vitro</i>	4–6	[20]
Мерцательный эпителий при бронхиальной астме легкого течения	6–7	[21]
Мерцательный эпителий в биоптате при бронхиальной астме среднетяжелого течения	4–8	[21]
Культивированный мерцательный эпителий, первый пассаж	9–10	Собственные данные
Культивированный мерцательный эпителий, второй пассаж	8–10	Собственные данные



Рис. 3. Монослойные колонии клеток мерцательного эпителия трахеи человека, первый пассаж. Ув. 200.

образование аналогичных монослойных колоний мерцательного эпителия различного размера с наличием синхронного или асинхронного движения ресничек аналогичной частоты (рис. 3). Однако полученные колонии отличались меньшей скоростью роста.

Обсуждение

Полученные данные подтверждают возможность культивирования мерцательного эпителия человека *in vitro* с получением пассируемых клеточных культур, обладающих аналогичными морфофункциональными характеристиками с клетками, принимающими участие в образовании слизистой оболочки дыхательных путей, без использования сложных дорогостоящих носителей, помогают оптимизировать условия его культивирования, вносят дополнительный вклад в изучение механизмов воздействия клеточного микроокружения на мерцающие клетки слизистой оболочки.

Полученные в результате настоящего исследования культуры клеток отличаются высокой долей клеток мерцательного эпителия и его прогениторных клеток в монослое с минимально возможным числом фибробластов, сохраняя при этом максимально высокие темпы прироста эпителиальных клеток при относительной простоте культивирования. Культуры клеток обладают морфологическими и функциональными характеристиками, соответствующими таковым применительно к здоровой слизистой оболочке трахеи, что подтверждается результатами световой микроскопии и специального исследования активности клеточного цилиарного аппарата. Частота мерцания ресничек в полученных колониях соответствует таковой в здоровой слизистой оболочке трахеи и бронхиального дерева человека, что указывает на функциональную полноценность культивируемой ткани (см. табл.).

Между тем именно оценка функциональной активности мерцающих клеток в культуре позволяет выявить наиболее значимые ее особенности. К настоящему времени показано, что мерцательный эпителий отчетливо реагирует на патологические изменения микроокруже-

ния, условий клеточной ниши и снижение температуры окружающей среды снижением частоты мерцания ресничек [19]. Так, при возникновении воспалительного процесса слизистой оболочки или экспериментальном воздействии на клетки слизистой оболочки маркерами воспаления происходит снижение частоты биения ресничек с 10–11 до 4–6 Гц. Такое явление можно наблюдать, например, при изучении бронхиальных биоптатов, полученных от пациентов, страдающих бронхиальной астмой. Некоторым исследователям удалось установить наличие корреляции между тяжестью течения заболевания, активностью воспалительного процесса и степенью нарушения цилиарной активности и сделать обоснованное предположение о существенной роли снижения двигательной активности цилиарного аппарата в нарушении бронхиальной проходимости (см. табл.) [19–21].

Более активный рост колоний мерцательного эпителия в опытных лунках по сравнению с контрольными свидетельствует о непосредственном стимулирующем влиянии продуктов жизнедеятельности и клеточных факторов роста, содержащихся в кондиционированной среде фибробластов линии 3Т3, на прогениторные эпителиальные клетки.

Особенностью культивирования в данном случае становится значительно менее выраженная активность фибробластов в таких лунках что, по-видимому, является следствием реципрокного торможения деления фибробластов продуктами жизнедеятельности данной клеточной линии, в избытке содержащимися в кондиционированной среде. Значимость последнего наблюдения подчеркивается тем, что избыточное число фибробластов становится существенным недостатком в том случае, если культивируемый эпителий будет использоваться для последующей загрузки трахеальных матриксов и трансплантации, т.к. потенциально наличие излишнего числа фибробластов во внутреннем просвете трахеи с учетом их более интенсивной пролиферации и роста относительно эпителиальных клеток может приводить к образованию рубцовой ткани и рестенозированию просвета трахеи. Кроме того, образование многослойных колоний ухудшает визуализацию мерцательного эпителия.

Специальный микропористый фильтр в дне каждой вставки не позволяет питательным средам смешиваться, но вместе с тем продукты жизнедеятельности фибробластов, сигнальные молекулы и факторы роста, содержащиеся в кондиционированной среде, постепенно, дозированно проникают в лунку, оказывая стимулирующее воздействие на культивируемые эпителиальные клетки.

Использование кондиционированной среды, получаемой с использованием стандартной чистой культуры фибробластов клеточной линии 3Т3, позволяет достичь максимальной стандартизации состава применяемой для культивирования эпителиоцитов среды и дает уверенность в отсутствии в ней сигнальных молекул клеток других типов.

Таким образом, использование кондиционированной среды клеточной линии фибробластов 3Т3 при культивировании мерцательного эпителия позволяет создавать специфический эффект присутствия фибробластов в культуре и вносит существенный вклад в создание «клеточной ниши» для эпителиальных клеток, позволяя получать более крупные колонии мерцательного эпителия при подавлении роста фибробластов в окружающем монослое. Более интенсивный режим смены питательных сред относительно методик, применявшихся другими исследователями, обусловлен быстрым истощением кон-

диционированной среды ЗТЗ. Кроме того, частая замена питательных сред обеспечивает лучшую их оксигенацию в культуральной лунке.

Получение крупных колоний мерцательного эпителия представляет особенный интерес в связи с тем, что, как было показано, в основном именно они характеризуются наличием синхронного пропульсивного движения ресничек, что служит залогом функционирования полноценного мукоцилиарного клиренса в трахее человека. Таким образом, именно крупные колонии эпителиальной ткани дыхательных путей и их агрегации представляют интерес в дальнейшем для последующего нанесения в просвет тканеинженерных конструкций трахеи.

Постепенное снижение скорости роста эпителиальных клеток при длительном культивировании в условиях *in vivo* предположительно является следствием истощения потенциала прогениторных клеток.

Отсутствие сложной органической подложки или носителя удешевляет получение культуры и отчасти обеспечивает успешное перемещение клеточной культуры с последующим повторным образованием мерцающих колоний и клеточных групп, что позволяет сделать предположение о возможности переноса прекультивированного *in vitro* мерцательного эпителия на трахеальные матриксы с целью их последующей трансплантации животным в рамках доклинических исследований.

Наличие функционирующего мерцательного эпителия в просвете тканеинженерной трахеи, подлежащей пересадке реципиенту, может стать залогом раннего восстановления естественного мукоцилиарного клиренса, что в свою очередь поможет избежать многих существующих в настоящее время осложнений, зачастую угрожающих жизни пациента (таких, как обструкция просвета трахеи слизистыми пробками, стенозирование трансплантата). Исчезновение необходимости в проведении большого числа санационных бронхоскопий в отдаленном (а, возможно, и раннем) послеоперационном периоде существенно ускорит темпы реабилитации пациента, повысит качество его жизни и значительно снизит стоимость лечения, а также уменьшит сроки пребывания в стационаре на послеоперационном этапе. Необходимо подчеркнуть, что наличие прототипа функционирующей слизистой оболочки в трансплантате уже на момент операции может предупредить разрастание грануляционной и рубцовой ткани в его просвете, таким образом предотвратив наиболее грозное осложнение в виде стенозирования трахеи.

Дальнейшие исследования должны быть направлены в т.ч. на совершенствование методов верификации типов культивируемых клеток с целью определения наличия или отсутствия бокаловидных клеток, что будет более точно характеризовать потенциал получаемых клеточных культур в формировании прототипа слизистой оболочки дыхательных путей. Кроме того, в настоящее время проводятся исследования, направленные на оптимизацию методики культивирования с целью создания возможности последующей трансплантации получаемой ткани пациенту в составе сложной тканеинженерной конструкции, а также на увеличение возможных сроков культивирования мерцательного эпителия с предотвращением его преждевременной регрессии, совершенствование технологий его пассирования.

Таким образом, несмотря на сложность и неоднозначность существующих проблем тканевой инженерии трахеи, решение некоторых из них представляется возможным в самое ближайшее время, и можно с большой степенью вероятности утверждать, что в течение ближайшего десятилетия новые технологии в тканевой инженерии трахеи будут доведены до высокой степени совершенства и начнут широко внедряться в медицинскую практику.

Заключение

Результаты проведенного исследования позволяют по-новому взглянуть на проблему получения эпителия дыхательных путей для тканевой инженерии трахеи. Предложенная методика обеспечивает воспроизведение морфологически и функционально полноценного мерцающего эпителия, что позволяет сделать предположение о его способности обеспечить мукоцилиарный клиренс в условиях формирующейся слизистой оболочки трахеи в послеоперационном периоде. Дальнейшие исследования в данной области следует направить на совершенствование технологий пассирования получаемых клеток.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Stein A, Quebral R, Boba A, Landmesser C. Post Mortem Evaluation of Laryngotracheal Alterations Associated with Intubation. *Ann. Surg.* 1960;151(1):123–138.
- Berg M, Ejnell H, Kovács A, Nayakawde N, Patil PB, Joshi M, Aziz L, Rådberg G, Hajizadeh S, Olausson M, Sumitran-Holgersson S. Replacement of a tracheal stenosis with a tissue-engineered human trachea using autologous stem cells: a case report. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(1–2):389–397.
- Jorissen M, van der Schueren B, van den Berghe H, Casserman JJ. Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(12):975–982.
- Lim M, Jungebluth P, Sjöqvist S, Nikdin H, Kjørtansdóttir KR, Unger C, Vassliev I, Macchiarini P. Decellularized feeders: an optimized method for culturing pluripotent cells. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(12):975–982.
- Brian W, Aigner J, Staudenmaier R, Lemparta K, Macka B, Happa T, Sittlinger M, Endres M, Naumanna A, Kastenbauer E, Rottera N. The characterisation of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement. *Biomaterials.* 2002;23(6):1425–1438.
- Gonfiotti A, Jaus M, Barale D, Baiguera S, Comin C, Lavorini F, Fontana G, Sibila O, Rombolà G, Jungebluth P, Macchiarini P. The first tissue engineered airway transplantation: 5 year follow up results. *Lancet.* 2014;383(9913):238–244.
- Delaere P, Van Raemdonck D. The trachea: the first tissue engineered organ? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;147(4):1128–1132.
- Gonfiotti A, Jaus M, Barale D, Baiguera S, Comin C, Lavorini F, Fontana G, Sibila O, Rombolà G, Jungebluth P, Macchiarini P. The first tissue engineered airway transplantation: 5 year follow up results. *Lancet.* 2014;383(9913):238–244.

9. Jorissen M, Van der Schueren B, Van den Berghe H, Cassiman J. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Arch Otorhinolaryngol.* 1989;246:308–314.
10. Jorissen M, van der Schueren B, van den Berghe H, Casserman JJ. Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur Respir J.* 1991;2:210–7
11. Trump BF, Resau J, Barrett LA. Methods of organ culture for human bronchus. In: *Methods in Cell Biology.* CC Harris, BF Trump, GD Stoner (eds.). New York: Academic Press. 1980. P. 1–14.
12. Cull D, Lally K, Mair E, Diadone M, Parsons D. Tracheal reconstruction with polytetrafluoroethylene graft in dogs. *Ann Thorac Surg.* 1990;50:889–901;
13. Bottema J, Wildevuur C. Incorporation of microporous teflon tracheal prosthesis in rabbits: evaluation of surgical aspects. *J Surg Res.* 1986;41:16–23
14. Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K. Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. *Laryngorhinootologie.* 2000;79(3):160–164.
15. Bücheler M, Scheffler B, von Foerster U, Bruinink A, Bootz F, Wintermantel E. Growth of human respiratory epithelium on collagen foil. *Laryngorhinootologie.* 2000;79(3):160–164.
16. DeJong P, van Sterkenburg M, Hesselting S, Kepenaar J, Mulder A, Mommaas A, Dijkman J, Ponec M. Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the airliquid interface. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;10:271–277.
17. Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K. Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. *Biomaterials.* 2010;31(18):4855–4863.
18. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Wada I, Nakamura T, Omori K. A tissue engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose derived stem cells. *Biomaterials.* 2010;31(18):4855–4863.
19. Yager J, Chen TM, Dulfano MJ. Measurement of frequency of ciliary beats of human respiratory epithelium. *Chest.* 1978;73:627–633.
20. Kirtsreesakul V., Somjareonwattana P., Ruttanaphol S. The correlation between nasal symptom and mucociliary clearance in allergic rhinitis. *Laryngoscope.* 2009;119(8):1458–1462.
21. Ошур ЛЮ. Мукоцилиарный клиренс и бронхиальная проходимость при стандартной базисной терапии у больных бронхиальной астмой. *Автореф. дис. ... канд. мед. наук.* Владивосток. 2004. 126 с.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Барановский Денис Станиславович, младший научный сотрудник НИИ молекулярной медицины
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Адрес: 119992, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **тел.:** +7 (495) 609-14-00, **e-mail:** dennissb@mail.com

Люндуп Алексей Валерьевич, кандидат медицинских наук, заведующий отделом биомедицинских исследований
НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Адрес: 119992, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **тел.:** +7 (495) 609-14-00, **e-mail:** lyundup@gmail.com

Паршин Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением торакальной
хирургии Университетской клинической больницы № 1 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Адрес: 119992, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **тел.:** +7 (495) 609-14-00, **e-mail:** vdparshin@yandex.ru