

УДК 576.5
УДК 57.085.23

И.М. ВОЛКОВА*, Д.Г. КОРОВИНА

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко,
Москва, 109428

e-mail: akoulinairina@mail.ru

Трехмерные матриксы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии

Обзор посвящен классификации, анализу, характеристике и перспективам использования различных типов матриксов природного и синтетического происхождения в клеточной биотехнологии. Особое внимание уделено трехмерным структурам, созданным на основе компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК). В частности, авторы обзора выделили из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) сельскохозяйственных (с/х) животных клеточные популяции с фенотипом, подобным ММСК. Проведен сравнительный анализ свойств и признаков полученных популяций клеток. Установлено, что ММСК, выделенные из КМ и ЖТ, способны формировать клетки жировой, костной, а также мышечной тканей при культивировании в индукционных средах *in vitro*. Показано, что получение аналогов мышечной ткани с/х животных для нужд регенеративной медицины, ветеринарии, клеточной и пищевой биотехнологии в процессе миогенеза при трехмерном культивировании ММСК на пористых носителях является перспективным направлением.

Ключевые слова: клеточная биотехнология, костный мозг, 3D-культивирование, матрикс, миодифференцировка, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, мышечная ткань, 3D-структуры, *in vitro*.

Клеточная регенерация поврежденных тканей и органов человека и животных представляет собой одну из важных задач современной клеточной биологии, медицины, ветеринарии и биотехнологии. Трехмерное культивирование клеток млекопитающих становится приоритетным в многочисленных биомедицинских, ветеринарных и биотехнологических областях применения: при исследовании нормальной физиологии

и биохимии клеток, тестировании разнообразных химических соединений, лекарственных препаратов, пищевых добавок, при выращивании искусственных тканей и органов, синтезе ценных биологических веществ, токсикологическом тестировании (в качестве заменителя тестирования на животных), а также для получения пищевого животного полноценного белка без убоя животных.

Волкова Ирина Михайловна, Коровина Дарья Григорьевна.

Список сокращений: ВКМ — внеклеточный матрикс; ГА — гидроксипатит; ГК — гиалуроновая кислота; ЖТ — жировая ткань; КГА — карбонатгидроксипатит; КМ — костный мозг; КРС — крупный рогатый скот; ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; ПГА — полигидроксиалканоаты; ПК — полигликолевая кислота; СК — стволовые клетки; с/х — сельскохозяйственный; УФ — ультрафиолетовый; ФСБ — фосфатно-солевой буфер; АМ — *Antheraea mylitta*; ВМ (*Bombyx mori*) — тутовый шелкопряд; GelMA — гидрогель на основе сополимера желатина с метакрилатом; GMP (**good medical practice**) — правила ответственной медицинской практики; ISCT (International Society for Cellular Therapy) — Международное общество клеточной терапии; SDF-1 (**stromal cell-derived factor 1**) — стромальный клеточный фактор 1.

* Автор для переписки.

Одним из наиболее перспективных культур клеток, которые используются для этих целей, являются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, первоначально обнаруженные в стро-ме костного мозга [1]. Затем они были найдены в других органах: плаценте, пуповине, печени и жировой ткани [2, 3]. ММСК представляют большой интерес в связи с их основными свойствами и признаками: способностью самообновляться *in vitro* без анеуплоидии; способностью пролиферировать в культуре длительное время, образуя стабильные диплоидные клеточные линии; способностью формировать клетки тканей мезенхимного происхождения *in vitro* при индукции к дифференцировке; низкой иммуногенностью и иммуносупрессивными свойствами в отношении Т-клеток.

Международным обществом клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy (ISCT)) были установлены минимальные критерии, характеризующие ММСК [4]. Согласно определению, ММСК — это группа гетерогенных клеток, адгезивных к пластику, которые могут быть выделены из КМ, ЖТ, плаценты, пуповинной крови или из любых других тканей. ММСК не несут поверхностных маркеров, специфичных для гематопозитических линий клеток (CD19, CD34, CD45 и HLA-DR), эндотелиальных клеток (CD31, CD144 и VEGFR-2) и содержат маркеры CD73, CD90, CD105, CD166, CD146 и NG2 [4, 5]. ММСК способны при индукции формировать мезодермальные клеточные популяции, из которых в ходе эмбрионального развития образуются костно-хрящевая ткань, строма КМ, мышцы, ЖТ и сухожилия [3, 5]. Другим преимуществом данных клеток, объясняющим их широкое применение в клеточной терапии, является их крайне низкая иммуногенность, что обеспечивает возможность пересадки клеток от любого неродственного донора любому реципиенту без использования иммуносупрессивной терапии [6]. Кроме того, ММСК обладают иммуносупрессивными свойствами в отношении Т-клеток [7], что делает первые эффективным терапевтическим агентом при лечении больных с остро выраженной реакцией отторжения трансплан-тированной ткани по причине тканевой несовместимости.

Благодаря вышеперечисленным свойствам ММСК нашли применение в клеточной терапии широкого круга патологий, включая сердечно-сосудистые заболевания, инсульт, остеоартрит, несовершенный остеогенез, фиброз печени и др. ММСК, выделенные из КМ, способны секретировать как компоненты ВКМ (фибронектин, коллагены типа I, II, III, IV, V, VI, протеогликаны, лами-

нин) [8, 9], так и комплекс цитокинов с противовоспалительным и антиапоптотическим действием, а также хемокины, участвующие в поддержании гемопоэза (ИЛ 6, ИЛ 7, ИЛ 8, ИЛ 11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-1 α), факторы роста СК, гепатоцитов, макрофагов и гранулоцитарно-макрофагов [8]. Известен хоуминг-эффект ММСК из КМ (способность мигрировать к поврежденной ткани, встраиваться в нее и перерождаться в клетки данного органа), реализующийся через выработку цитокина SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) [9]. Среди компонентов ВКМ, продуцируемых ММСК, следует отметить фибронектин, ламинин, коллаген и протеогликаны, принимающие основное участие в организации межклеточного взаимодействия и развитии ВКМ костного мозга и костной ткани.

Доказано, что ММСК, выделенные из КМ, создают стромальное микроокружение, обеспечивающее индуктивными и регуляторными сигналами не только ММСК, но и гемопоэтические предшественники и другие немезенхимные СК КМ [5].

ММСК являются адгезивной клеточной культурой. Кинетика роста таких культур зависит от многих составляющих, в том числе от состава питательной среды, температуры, заряда, адгезивных свойств полимера и плотности посева клеток. Традиционно в последние десятилетия для культивирования ММСК используют культуральные флаконы, чашки Петри и многоруночные культуральные планшеты. К недостаткам такого способа выращивания (так называемое 2D-культивирование) можно отнести ограниченную площадь поверхности культуральных сосудов, что ведет к быстрому заселению ее клетками и снижению их пролиферативной активности вследствие контактного торможения, а также истощение питательной среды. Приведенные причины обуславливают необходимость периодического посева клеток с использованием новой культуральной посуды и новой питательной среды. Таким образом, накопление адгезивной клеточной культуры традиционным способом *in vitro* — длительная, дорогостоящая и многоэтапная процедура.

Двумерная (2D) культура клеток явилась объектом, с использованием которого получены основные современные научные знания в области клеточной биологии, фармакологии, онкологии, молекулярной биологии, дифференцировки СК, морфогенеза тканей, а также динамического равновесия между функцией клеток и их взаимодействием с микроокружением. В то же время, в традиционной 2D-культуре невозможно реконструировать то микроокружение клетки, которое существ-

ует *in vivo*, и таким образом поддерживать функции дифференцированных клеток. Методы культивирования клеток в трехмерном пространстве (3D-культивирование) способны устранить ограничения, свойственные 2D-культурам. 3D-системы включают многочисленные динамично взаимодействующие типы клеток и тканей, механические компоненты среды и биохимическое микроокружение. Каждый тип клеток *in vivo* имеет свое специфическое 3D-микроокружение. Ниша СК по сути также трехмерна, и ее биохимия и топология сильно влияют на процесс дифференцировки клеток [10]. Основными положительными отличиями 3D- от 2D-культивирования являются следующие:

— ММСК сохраняют присущую им *in vivo* эллипсоидную форму с размерами 10—30 мкм вместо типичного диаметра в 3 мкм в монослое;

— в 2D-культурах клетки прикрепляются к субстрату и уплощаются с образованием несвойственных им в естественном состоянии клеточных контактов. При этом около 50% их поверхности соприкасаются с жидкостью и почти 50% — с плоской поверхностью культурального сосуда. Непосредственный контакт клетка — клетка ограничивается менее чем 5% общей поверхности клеточной мембраны. В 3D-культурах клетки сохраняют трехмерную структуру, и почти вся поверхность доступна контакту с другими клетками (до 70% общей поверхности клеточной мембраны);

— в 3D-культуре у клеток наблюдаются лучшие дифференцировка, экспрессия генов, реакция на стимуляцию, метаболизм лекарственных веществ и общий уровень функционирования; они отличаются большей приближенностью к состоянию *in vivo* и повышенной жизнеспособностью [10].

Для перевода адгезивных культур клеток, к которым относятся ММСК, в 3D-состояние используется прием, основанный на культивировании клеток на матриксах-носителях. Поэтому выбор матрикса — первый ключевой этап в получении 3D-культур клеток. Основными свойствами биологически совместимого матрикса для 3D-культивирования ММСК должны быть отсутствие цитотоксичности, способность поддерживать адгезию, фиксацию, дифференцировку или предотвращение дедифференцировки помещенных на ее поверхность клеток, отсутствие воспалительной реакции на материал и иммунного ответа, достаточная механическая прочность в соответствии с назначением и способность к биорезорбции обычными метаболическими путями [11].

В настоящее время существует большой выбор матрикса, различных по материалу, из кото-

рого они изготовлены, по форме, твердости, размеру пор и целевому назначению.

Цель данного обзора — обобщить информацию о матриксах, которые используются для трехмерного культивирования клеток млекопитающих, в том числе ММСК, и об их воздействии на цитодифференцировку в направлении миогенеза.

ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ МАТРИКСЫ ДЛЯ 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Для создания матрикса используют различные материалы: пластмасса (полистирол, полиэтилен, полиэфир, полипропилен), стекло, акриламид, диоксид кремния, силиконовый каучук, натуральный коралл, целлюлоза, декстран, коллаген (желатин), гликозаминогликаны и др. От их химического, физического и геометрического эффекта на клетки зависит область и возможность их использования. Эти материалы можно разделить на две группы — природные и синтетические матриксы; особую группу матрикса составляют гели как природного, так и синтетического происхождения.

Природные матриксы

Данные матриксы обычно имеют белковую (коллаген, желатин, фибрин, матригель, эластин) или полисахаридную (гиалуриновая кислота, хитозан, агар, декстран, альгинат) природу [12]. Они обеспечивают клеткам необходимое микроокружение для создания межклеточных взаимодействий и регуляторных систем межклеточных сигналов, а также стимулируют пролиферацию и функциональные характеристики в гораздо большей степени, чем традиционные 2D-культуры тканей [10, 13]. Например, ММСК, выделенные из КМ человека, участвуют в регенерации кости в присутствии скелетов морских губок [14], нейроны образуются на нановолокнах шелка [15], а жировая ткань — в желатине [16]. Помимо механической поддержки природные подложки могут содержать биологические агенты, которые влияют на развитие СК.

Прямой способ получения природного матрикса для последующего создания биоинженерного органа — децеллюляризация целого органа путем обработки его коллагеназами и мягкими детергентами для полного удаления клеток и максимального сохранения в целостности его микроструктуры [17]. К последней относится также сеть кровеносных сосудов внутри органа, что позволяет



Рис. 1. Лиофилизованная пористая губка из хитозана.
Увеличение $\times 1$



Рис. 2. Бусины на основе хитозана.
Увеличение $\times 1$

решить проблему снабжения кислородом и питательными веществами клеток, которыми данный матрикс засеивается и которые культивируются на нем в биореакторе.

В развитии современной тканевой инженерии приоритетным направлением является разработка матриц, из биоматериалов, которые обладают следующими уникальными свойствами. Они должны быть достаточно прочными химически и механически, неонкогенными, неиммуногенными и немутагенными. Другое важное свойство биоматериалов — их биосовместимость. Данная характеристика определяется химическим составом биоматериала, его гидрофильностью/гидрофобностью, зарядом, формой и размером матрикса. Поверхностные физико-химические характеристики биоинженерного материала определяют его адгезивные свойства и способность белков и клеток взаимодействовать с ним [11, 18]. В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биодеградируемым нативным полимерам (альгинаты, коллаген, желатин, хитозан) и полиэфирам микробного происхождения — полиоксибутиратам и их сополимерам — которые синтезируют прокариотические микроорганизмы в специфических условиях. Природные полимеры помимо высокой степени биосовместимости с организмом являются высокоэффективными биостимуляторами. Они расщепляются на более простые соединения, которые выводятся из организма, либо принимают активное участие в биосинтетических процессах [10].

Исходя из перечисленных требований хорошей основой матриц может быть хитозан — природный биополимер-полиэлектролит, обладающий уникальным комплексом физико-химических свойств и широким спектром биологической

активности [19]. Авторами работы [20] описывается технология получения лиофилизованной пористой губки (рис. 1) и макропористых гранул (бусин) (рис. 2) из хитозана (диаметр пор 30—150 мкм). Гранулы обладают развитой адгезивной поверхностью, к которой легко прикрепляются клетки. Большой размер пор позволяет клеткам фиксироваться в них и обеспечивает диффузию питательных веществ. Биоактивность хитозана обусловлена тем, что в его основе лежит N-ацетил-глюкозамин — углеводная составляющая внеклеточной основы костной и хрящевой тканей.

Специалисты из Института металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН создали матрицы в виде вспененного хитозана с желатином и провели их доклинические испытания. Биологические испытания были выполнены в Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена. Испытания *in vitro* проводили на фибробластах человека. Выяснилось, что клетки хорошо растут на пене из средне- и высокомолекулярного хитозана, в то время как низкомолекулярный хитозан оказался токсичным. Исследователи выбрали первые два биополимера, так как пена из них была более пористой и упругой, чем матрикс из гидроксиапатита, который обычно применяют для восстановления кости. Благодаря этому хитозановую пену можно заселить клетками костной ткани и плотнее прижать ко всей поверхности поврежденной кости. Желатин в композиции служит источником аминокислот для развития клеток. Обычно в этой роли выступает коллаген, однако он способен вызывать иммунный ответ; желатин же такого ответа не вызывает, поэтому матрикс на его основе не отторгается организмом [21].

Группа ученых из Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена [22] представили результаты исследований спектра искусственных биокерамических материалов и скелета натуральных кораллов семейства *Acropora*, а также структуры на их основе с фиксированными аутогенными ММСК крыс и баранов для замещения костных дефектов. Было показано, что использованные керамические материалы (ГА, КГА, их комбинации в разных соотношениях, а также SiO₂-ГА) обладают недостаточной скоростью биорезорбции, в результате чего через год их остатки в месте дефекта оказывались замурованными в костную ткань, что, безусловно, снижает ее прочностные свойства. В то же время, скорость биорезорбции натурального коралла семейства *Acropora* (при использовании как в гранулированном виде у крыс, так и в виде цельного имплантата у барана) соответствовала скорости неоостеогенеза.

Многие исследователи для культивирования клеточной биомассы используют микропорошки различных веществ, в частности кремнезема (SiO₂). Авторы работы [23] предлагают наносить на традиционно используемую культуральную поверхность пленку из коллоидного аморфного кремнезема толщиной < 100 нм, которая обеспечивает хорошую смачиваемость и адгезию для клеточных культур и, как следствие, высокую скорость их роста и более длительный рост (до контактного торможения) благодаря развитой поверхности. Однако такую пленку нельзя отнести к полностью биоинертным, так как она содержит биоактивные группы Si-OH. Кроме того, сами авторы отмечают, что пленка частично растворима в культуральной среде (неконтролируемый процесс), что приводит к обогащению микроокружения клеток кремнием. Следует отметить, что несмотря на развитую поверхность пленки культивирование клеток происходит в тонком слое и, таким образом, его продолжительность ограничивается контактным торможением, преодолеть которое можно заменой культуральной посуды и среды культивирования.

Гиалуроновая кислота (ГК) — естественный компонент межклеточного вещества мягких тканей. ГК является перспективным материалом для создания матриксов в восстановительной хирургии и тканевой инженерии. Одна молекула ГК способна связывать до 1000 молекул воды. Считается, что ГК в значительной степени ингибирует пролиферацию фибробластов. Следует отметить, что на поверхности ММСК млекопитающих имеется рецептор CD44 для связывания ГК, что делает этот материал перспективным для 3D-культивирования.

ГК входит в состав многих коммерческих матриксов. К ним относятся пленки HYAFF на основе химически модифицированной ГК, которые исследовались в качестве субстрата для культивирования фибробластов человека [24]. Благодаря содержанию ГК и оптимальному составу других трофических веществ пленка способствует сохранению жизнеспособности и митотической активности клеток, культивируемых на ней. Биопластический материал «Гиаматрикс» был создан методом фотохимического наноструктурирования гидроколлоида ГК без использования дополнительных реагентов [25]. Проведенные исследования показали, что гиаматрикс наряду с эластичностью обладает высокой адгезией к раневым поверхностям покровных тканей, что позволяет лечить пациентов, имеющих дефекты кожных покровов, с минимальным количеством перевязок.

Наиболее распространенным материалом для изготовления медицинских и ветеринарных изделий, в том числе имплантатов, а также носителем для объемного наращивания клеточной биомассы является коллаген. Впервые коллагеновый гель как биоматрикс для клеточных культур применил Bell с соавт. [26], которые исследовали инкорпорацию клеток в гелеобразную структуру. В работе [27] показано отсутствие изменений в цитоморфологических и функциональных характеристиках гепатоцитов при их культивировании в коллагеновом геле и коллагеновом «сэндвиче» (структура, состоящая из двух пластин и слоя коллагена между ними). Авторы [28] продемонстрировали, что культивирование ММСК человека в коллагеновом геле значительно улучшает их способность к дифференцировке в направлении хондроцитов и остеоцитов.

В зависимости от источника коллагеновых волокон различают 13 типов коллагена. Так например, коллаген из дермы кожи, костей, связок и сухожилий позвоночных принадлежит к типу I; из хрящей — к типу II; из дермы кожи плода — к типу III; из базальных мембран сосудов — к типу IV, из скелетной мышцы — к типу VI [29]. Чем больше номер типа коллагена, тем меньше его иммуногенность. Интересно, что технология выращивания ММСК, выделенных из ЖК человека, в матриксе, который состоял из денатурированного коллагена типа I (наиболее иммуногенного), все же позволяет успешно сохранить адипогенный потенциал культивируемых клеток и достичь клеточной плотности, достаточной для последующей пересадки с целью регенерации жировой ткани [15].

Коллаген представляет собой субстрат, необходимый для узнавания клетками друг друга, их

прикрепления, пролиферации и дифференцировки; он обладает исключительно слабыми антигенными, анафилактическими и токсическими свойствами. При введении коллагена в организм он подвергается быстрой резорбции; расщепляясь, он стимулирует репаративные процессы, в частности, образование собственного коллагена организма, обладает гемостатическими свойствами. Продуктами полной деградации коллагена являются углекислый газ и вода. Основным недостатком коллагеновых изделий — их быстрая биодеградация (резорбция) при имплантации. Однако при получении большого объема мышечной ткани для нужд пищевой биотехнологии этот недостаток становится достоинством.

К изделиям на основе коллагена можно отнести протезы сосудов и клапанов сердца, коллаген-полимерные композиты, коллагеновые покрытия, пластыри, пленки, губки, диски, гели, костные биодеградируемые фиксаторы для восстановления хрящевой ткани, лечения раневых, ожоговых травм, язв, дефектов кожи и стоматологических заболеваний воспалительного характера. Коллаген применяют в форме цилиндров, сфер, губки, геля, пленки и композитов с различными полимерами [30, 31]. Из коммерческих вариантов стоит отметить рассасывающиеся матриксы Geistlich Mucograft™, Mucograft™/Mucograft Seal™ (Швейцария), а также отечественный каркас на основе недеминерализованного костного (бычьего) коллагена ОСТЕОДЕНТ-Т™ для репарации костной ткани [30, 31].

Сотрудниками отдела биоинженерных технологий и тканевой инженерии Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова были проведены исследования тканеспецифичных мелкодисперсных гранул, полученных из хрящевых (коллагеноподобных) мембран, выделенных из оболочки диафрагмы бычков и содержащих коллаген тип II, для создания хрящевой ткани *in situ*. Проведенные биологические исследования *in vitro* показали соответствие всех образцов мелкодисперсного биоматрикса требованиям стандартов биологической безопасности. Функциональные свойства биоматрикса оценивали по метаболической активности фибробластов мышцы линии *NIH 3T3* на поверхности матрикса. Было установлено, что изученные матриксы на основе коллагена II типа стимулировали процессы адгезии и пролиферации клеток, а самая мелкодисперсная фракция (средний размер частиц 230 мкм) обеспечивала более интенсивную и продолжительную пролиферацию клеточной культуры. Таким образом, полученные

результаты по биостабильности, цитотоксичности и функциональным свойствам мелкодисперсных биоматрикса позволяют сделать вывод об их перспективности для тканевой инженерии хряща [32].

В качестве источника коллагена чаще всего используют кожу КРС и склеру глаза свиней. Появляются также сведения о новых источниках коллагена, например, рыбах и других водных животных. Исследования показали, что коллагены рыб соответствуют требованиям к матриксу для выращивания большинства типов культур клеток. Они образуют прочные, устойчивые и прозрачные покрытия на пластиковых и стеклянных поверхностях, давая отличные возможности для микрофотографии. Коллагены большинства видов рыб, обитающих в теплых водах, обладают термостабильностью, позволяющей использовать их для выращивания большинства культур клеток. Они также способны формировать устойчивые гидрогели и твердые матриксы. Так например, препарат Cellcampus (коллаген, изготовленный из чешуи тилапии, выращенной в аквакультуре, производитель — Taki Chemical Co., Ltd.) способствует росту клеток опухоли шейки матки человека (*HeLa*), клеток фибросаркомы мышцы линии *L929*, остеобластов мышцы линии *MC3T3* и клеток саркомы кости человека линии *Saos-2*. Этот препарат коллагена не подвергается денатурации при обычной для культуры клеток температуре (37°) и рекомендован для покрытия культуральных поверхностей. Матрикс, изготовленный из коллагена большой голубой акулы, был успешно использован для культивирования фибробластов при 30° [33]. Гель из коллагена ската также сохраняет форму при 37° и успешно использован для культивирования стромальных клеток мышцы [34]. Высокой термостабильностью обладают коллагены, полученные как из кожи, так и из мышечной ткани сома [35].

Коллагены других водных животных, в том числе амфибий, имеют некоторые преимущества по сравнению с коллагенами млекопитающих. Например, коллагены, выделенные из кожи лягушки, обладают повышенной гидрофильностью, по-видимому, в связи с физиологическими особенностями этих животных. Для культивирования кератиноцитов и фибробластов человека были успешно использованы высушенные и гидратированные гели из коллагенов амфибий [36]. Было показано, что коллаген морской губки *Ircinia fusca* может быть использован для тканевой инженерии кости. Пористые матриксы из коллагена медузы пригодны для выращивания культур клеток высокой плотности, обеспечивая в трехмерных матри-

ксах их высокоэффективное снабжение питательными веществами и кислородом [37]. Таким образом, коллаген является одним из наиболее эффективных биополимеров для создания матриксов, которые как можно более полно воспроизводят свойства идеальных ВКМ.

Другим природным материалом, который используется для 3D-культивирования клеток, является желатин из денатурированного коллагена. Дополнением к желатину в матриксах, как правило, служит коллаген. Такие матриксы могут быть различных размеров и форм: в виде сетки, цилиндра, сферы, гранул или волокнистой трехмерной губки. Одним из существенных преимуществ использования желатина в качестве трехмерного носителя является его устойчивость к обработке в автоклаве при стерилизации [10, 30].

Абсорбирующий матрикс на основе желатина, хитозана, целлюлозы или коллагена, который комбинируют с остеогенными клетками, а также с активными веществами, успешно используют для восстановления костной ткани. Проведенный сравнительный анализ эффективности репарации кости *in vivo* у крыс-самок линии *Wistar* с помощью матриксов на основе желатина с или без ММСК выявил значительные преимущества матрикса, дополненного ММСК [38]. Спустя 6 нед после остеозамещения матрикс рассасывался, а в области повреждения наблюдался активный остеогенез, который отсутствовал в случае с желатиновым матриксом без ММСК.

Методом замораживания—оттаивания были изготовлены пористые матриксы из фиброина шелка и композитные пористые матриксы с добавлением 10%, 20, 30, 40 и 50% желатина. Зависимость адгезии и скорости пролиферации клеток мышечных эмбриональных фибробластов от состава матрикса была изучена методом лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. Сделан вывод о том, что введение в структуру матрикса желатина увеличивает адгезию и ускоряет пролиферацию мышечных эмбриональных фибробластов; при этом оптимальное содержание желатина составляет 30% [39].

В работе В.Г. Богдана с коллегами из Белоруссии [40] приведен сравнительный анализ возможности использования в качестве матрикса для трехмерного культивирования ММСК, выделенных из ЖТ человека и крыс, материалов различного происхождения: гидрогелевой полимерной пластины с мирамистином, трехмерного коллагенового геля, приготовленного на основе биопластического коллагенового материала «Коллост», и трехмерного желатинового геля. Выявлены зако-

номерности, не позволяющие использовать гидрогелевую пластину с мирамистином, а также 0,3%-ный, 0,6%-ный и 1,5%-ный коллагеновый гель в качестве матрикса, связанные со степенью адгезии гидрогеля к ММСК, а также со снижением уровня жизнеспособности ММСК при фиксации [40]. Культивирование же ММСК ЖТ человека в течение 1 сут в трехмерном комбинированном геле на основе желатина с 20% обогащенной тромбоцитами аутоплазмы обуславливало распределение клеток по всему объему матрикса с достоверным ($p > 0,05$) сохранением высокого уровня их жизнеспособности (95,8% (93,1—97,5%)), который до внесения клеток в гель составлял 97,4% (96,7—99,1%).

Первичные культуры ММСК, растущие в геле на основе желатина, были использованы для трансплантации крысам после моделирования у них послеоперационных грыж с использованием и без полипропиленового сеточного трансплантата. Предложенный ВКМ на основе желатина обеспечивал не только эффективную доставку ММСК ЖТ по всей зоне трансплантации, но и позволял клеточным структурам активно интегрироваться в окружающие ткани [40].

Следующая группа матриксов на основе фибриногена и фибрина широко используется в тканевой инженерии, что обусловлено отсутствием у них иммуногенности и способностью имитировать организацию природных тканевых структур. Матриксы на основе фибрина и фибриногена могут обеспечивать высокую плотность заселения их клетками, равномерное их распределение по матриксу, высокую клеточную пролиферацию, миграцию и дифференцировку. Фибриноген обладает преимуществом перед фибрином, так как создает более благоприятную поверхность для точной адгезии и пролиферации — 3D-волокнистую структурную матрицу и наноструктурированную поверхность. Матрикс состоит из волокнистой белковой сети, способной к передаче клеточных сигналов и поддержанию взаимодействий клетка—матрикс и клетка—клетка [41]. На основе фибриногена и фибрина можно изготавливать различные микросферы, микроволокна, наночастицы, нановолокна и гидрогели. Так как матриксы на основе фибриногена и фибрина являются естественными компонентами ВКМ, они играют важную роль на ранних стадиях гемостаза и заживления ран в дополнение к фактору свертываемости крови. Кроме того, фибриноген содержит два интегрин-связывающих звена аргинин—глицин—аспартат, которые, как правило, соединяют эндотелиальные клетки и фибробласты. Фибриноген так-

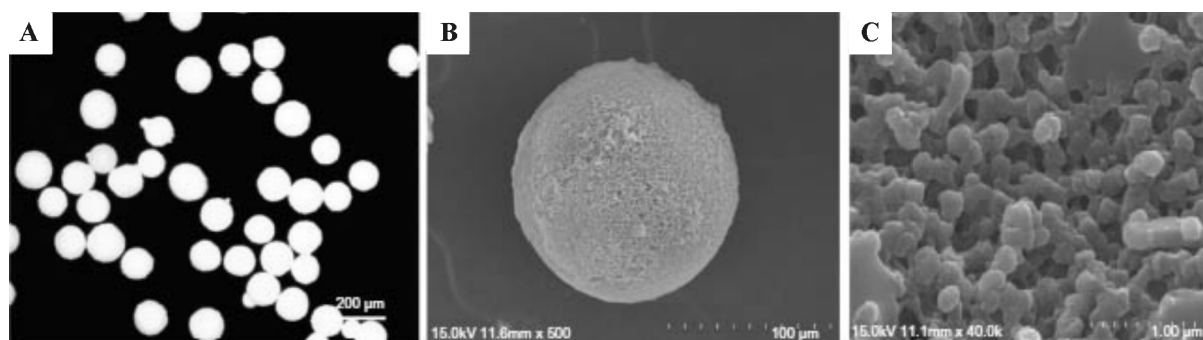


Рис. 3. А — микросферы на основе фибриногена; световая микроскопия показывает их сферичность и диаметр 100—150 мкм; В — изображение одной микросферы, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии; С — увеличенное изображение микросферы В; видна пористость матрикса [42]

же имеет высокое сродство к таким биомолекулам, как фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов и другие цитокины.

Группа ученых получила микросферы на основе фибриногена (100—150 мкм) с пористой структурой путем использования метода водно-жирового эмульгирования с дальнейшей экстракцией растворителем [42] (рис. 3). Используя описанный метод, можно контролировать размер сфер и их однородность путем изменения концентрации раствора фибриногена, скорости потока и частоты вращения мешалки. С помощью того же метода были также разработаны наносферы на основе фибрина. Однако следует отметить, что матриксы на основе фибрина и фибриногена имеют некоторые ограничения в использовании из-за слабой механической прочности и высокой скорости биodeградации. Механическая прочность при необходимости может быть повышена за счет либо смешивания с другими натуральными/синтетическими полимерами, либо путем кооперации микро/наносфер и клеток, в то время как биodeградацию можно регулировать с помощью различных сшивков.

Матриксы следующего поколения должны включать в себя факторы роста, другие биомолекулы, требуемые для соответствующих клеточных линий с целью ускорения и поддержания пролиферации и дифференцировки клеток. Компании Sigma-Aldrich® и Abcam® выпускают и продают порошки фибриногена и фибрина различного происхождения.

Среди природных полимеров для тканевой инженерии белок паучьего шелка фиброин демонстрирует самые высокие механические свойства [43]. Наиболее распространенный тип этого шелка вырабатывает насекомое *Bombyx mori* (ВМ, тутовый шелкопряд). Данный материал, добываемый из коконов, является широко используемым и

изучаемым натуральным полимером. Известно, что его применяли в качестве биомедицинского шовного материала на протяжении веков. Более поздние исследования шелкового волокна и пленок показывают, что волокна фиброина, входящие в их состав, обладают сопоставимой биосовместимостью *in vitro* с другими широко используемыми биоматериалами, такими как полимолочная кислота и коллаген. Фиброин имеет также контролируемую скорость деградации (от нескольких часов до нескольких лет) и может быть легко химически модифицирован с целью изменения свойств поверхности или встраивания различных факторов роста. Различными методами из коконов *Bombyx mori* были созданы гидрогели, трубки, губки, композиты, волокна, микросферы и тонкие пленки [44].

Появились сообщения об использовании в качестве ВКМ рекомбинантного шелка — спидроина [45]. Из него изготавливают пленки, волокна и сетки матрицы различной пористости. Рекомбинантный спидроин особенно интересен тем, что его можно модифицировать (васкуляризировать, встраивать необходимые факторы роста и пролиферации). Таким образом, каркасы, изготовленные из рекомбинантных аналогов спидроина, потенциально пригодны для использования в тканевой инженерии. В отличие от натурального фиброина рекомбинантный белок можно получать в промышленных масштабах, а также сравнительно легко модифицировать.

ГЕЛИ

Пористые гидрогели являются перспективным материалом для создания матриксов с целью 3D-культивирования клеток благодаря их способности воспроизводить основные свойства большинства мягких тканей. Ретикулярные структуры полимерных цепочек, соединенных поперечными

связями, содержат большое количество воды, облегчают транспорт кислорода, питательных веществ и продуктов метаболизма, а также растворимых факторов. Многие гидрогели могут формироваться в мягких условиях, благоприятных для живых клеток; их можно легко модифицировать для придания нужной вязкоэластичности и скорости деградации. Гель также может быть отделен от поверхности культурального сосуда, так как образует плавающую пластину при выращивании клеток. При этом клетки получают питательные вещества из среды, контактирующей с базальной стороной пластины, и имеют доступ к кислороду на поверхности [10].

Для создания гидрогелей используют разнообразные природные и искусственные полимеры — полисахариды (гиалуроновая кислота, глюкозамингликаны, декстраны), полиспирты (полиэтиленгликоль), полипептиды (желатин, денатурированные сегменты фибриногена) и др. Их подвергают различным химическим модификациям для контроля размера пор и степени пористости, адгезивных свойств, способности к постепенной деградации внеклеточными ферментами [46].

При создании биоинженерных конструкций необходимо, чтобы поры внутри трехмерного носителя были взаимосвязаны, имели размеры, оптимальные для инокуляции клеток, и обладали достаточной площадью для их последующего роста. Этим требованиям отвечают макропористые криогели — высокопористые гелевые системы, формирование которых осуществляется в неглубоко замороженной среде. Им присущи некоторые специфические особенности по сравнению с обычными гелями, формируемыми при температурах выше точки кристаллизации растворителя. Процессы криотропного гелеобразования полимерных систем протекают при неглубоком замораживании, выдерживании в замороженном состоянии и последующем оттаивании растворов или коллоидных дисперсий. После оттаивания замороженного образца получается крупнопористый гель (криогель), в котором на месте расплавившихся кристаллов растворителя остаются полости, заполняемые образующейся жидкостью. Таким образом, поликристаллы замороженного растворителя при формировании криогеля играют роль порогена и криогель отличает макропористость, причем эти макропоры взаимосвязаны [47].

В совместных работах ученых из Москвы и Харькова были исследованы различные условия культивирования ММСК человека в полимерных губках на основе макропористого агарозного криогеля. Были изучены различные методы введения

культуры клеток в носитель. Результаты свидетельствуют о возможности применения всех исследуемых вариантов посева: при любом варианте клетки адгезировали на внешней и внутренней поверхности пор, распластывались и пролиферировали. Ранее были проведены исследования по оценке биосовместимости, степени адгезивности, пролиферации, а также эффективности направленной дифференцировки ММСК при объемном культивировании на различных типах трехмерных носителей [48].

СИНТЕТИЧЕСКИЕ МАТРИКСЫ

Синтетические полимеры являются перспективными материалами для тканевой инженерии в связи с их отличительными характеристиками, а также возможностью получения полимера в промышленных масштабах [10]. В отличие от природных синтетические биополимеры имеют весьма широкий спектр свойств, которые могут контролироваться и быть изменены в соответствии со стандартами GMP. Они имеют предсказуемые и хорошо воспроизводимые механические и физические свойства (например, прочность на растяжение, модуль упругости, скорость деградации) и могут быть изготовлены с большой точностью. Неоспоримым преимуществом синтетических полимеров является возможность придания им нужных свойств, включая топографию поверхности, пористость, размер и геометрию пор, характер их распределения в конструируемом препарате и наличие каналов между порами. Данные полимеры позволяют создавать трехмерные биоинженерные структурные основы, обеспечивающие достаточно эффективную диффузию питательных веществ, продуктов метаболизма, сигнальных молекул, что позволяет контролировать процесс распространения, пролиферации и дифференцировки клеток внутри таких матриксов. К недостаткам синтетических полимеров можно отнести проблемы, связанные с прикреплением к ним клеток, воспалительные реакции, отсутствие биосовместимости и неспособность к интеграции с живыми тканями. Однако, как правило, синтетические материалы менее дороги, чем материалы природного происхождения, из них легко формировать трехмерные структуры, что делает их привлекательными для использования в качестве матрикса. Кроме того, существует возможность создания синтетических биоматериалов, обладающих биосовместимостью и способностью к биодеградации. В зависимости от химического состава все синтетические материалы для ВКМ можно разделить на не-

сколько подгрупп: металлические, полимерные и биокерамические.

Металлические материалы, как правило, содержат в себе металлические элементы (железо, титан, золото, алюминий) и используются в силу высокой механической прочности в ортопедии, ортодонтии, во внутренних электрических устройствах и в искусственных органах [49]. Выбор металлических материалов или сплавов для медицины проводят исходя из следующих свойств: биосовместимости, физических и механических свойств, характера старения материала. Наибольшее распространение получили нержавеющие стали, титан и его сплавы, сплавы кобальта. Сравнительно недавно разработан материал из никеля и титана (нитинол); он обладает памятью формы и получил в настоящее время широкое применение при создании различных устройств и имплантатов [50]. Благородные металлы (золото и платина) применяют в ограниченных масштабах для изготовления химически инертных протезов [51].

Более перспективным направлением для замещения тканей и восстановления их функций является применение полимерных пористых биодеградируемых материалов [52]. Синтетические полимеры и биокерамика стали наиболее подходящими материалами для достижения целей тканевой инженерии. Наиболее перспективными в применении считаются биокерамические материалы в связи с их биосовместимостью, высокой твердостью, тепло- и электроизолирующими свойствами, термо- и коррозионной стойкостью. Недостатками, ограничивающими применение керамики в медицине, является ее хрупкость и ломкость. По характеру взаимодействия с тканью ВКМ на керамической основе можно разделить на биоинертные и биоактивные. Инертная биокерамика, как Al_2O_3 , ZrO_2 , нетоксична, неаллергенна и является очень прочным материалом. Биостекло, стеклокерамика и биокерамика на основе фосфатов кальция относятся к биоактивным материалам. Наиболее часто используемым биокерамическим материалом является биокерамика на основе фосфатов кальция. В эту группу входят гидроксиапатит, трикальций-фосфаты и др. [50].

В настоящее время наиболее широко распространенными и используемыми в тканевой инженерии биодеградируемыми полимерами являются D,L-полимолочная кислота (полилактат), поли-L-молочная кислота (поли-L-лактат), полигликолевая кислота, полиангидриды, полифумараты, полиортоэфир, поликарбонаты и поликарбонаты [53, 54]. Другие синтетические полимеры, обладающие хорошими качествами для

создания тканеинженерных трехмерных матриц, — это полиуретаны. Эти материалы широко используются для конструирования пересаживаемых биомеханических заменителей органов (искусственное сердце, кардиостимуляторы, костные импланты) [55].

Помимо вышеописанных биоматериалов, применяемых для конструирования матриц функционирующих клеток, существует новый класс природных полимеров, которые синтезируют микроорганизмы. Это термопластичные линейные полиэфиры гидроксипроизводных алкановых кислот — полигидроксиалканоаты (ПГА), которые представляют большой интерес в связи с их высокой биосовместимостью и механической прочностью. Особо перспективным направлением использования ПГА является создание матриц для искусственных органов, для реконструкции «мягких» (хрящевой) и костной тканей. В настоящее время ПГА активно исследуют за рубежом. Среди малотоннажных производителей ПГА известны следующие компании: Monsanto, Metabolix Inc., Tepha, Proctor&Gamble, Berlin Packaging Corp., Bioscience Ltd., BioVentures Alberta Inc. и Merck. Они выпускают эти полимеры под марками Biopol®, Biopol™, TephaFLEX™, DegraPol/btc®, Nodax™. В России целенаправленные исследования отечественных ПГА проводят в Институте биофизики СО РАН [56]. Зарегистрирована торговая марка Биопластоган™ (Reg. Cert. N 315652 of the Federal Institute for Patent Examination). Авторами представлен обзор результатов исследования пригодности резорбируемых ПГА для разработки клеточных матриц различного типа. Использованы высокоочищенные образцы ПГА, синтезированные бактериями *Ralstonia eutropha* B5786 по технологии, обеспечивающей получение ПГА различной химической структуры. Так, с использованием ПГА в различных фазовых состояниях (растворы, эмульсии, порошки) получены и изучены структура и свойства 2D- и 3D-матриц в виде гибких прозрачных пленок, мембран, ультратонких волокон, микрочастиц, губок, объемных плотных и пористых конструкций. Показана возможность использования общепринятых методов для стерилизации матриц без изменения структуры, потери прочности и ухудшения адгезивных свойств поверхности, а также пригодность для выращивания клеток *in vitro*. С помощью культур фибробластов, гепатоцитов, клеток эндотелия и остеобластов исследована биосовместимость матриц *in vitro*. Микроскопия, прижизненное окрашивание клеток трипановым синим, анализ синтеза белка и ДНК культиви-

руемыми клетками, а также тест МТТ* позволили установить отсутствие цитотоксичности матриц из ПГА при прямом контакте со всеми исследуемыми клетками. Полученные результаты [56] позволяют рекомендовать ПГА — новый класс термостабильных, механически прочных, биосовместимых и резорбируемых полиэфиров — для создания тканеинженерных конструкций различных типов, необходимых для клеточной и тканевой инженерии.

РАЗМЕР, ФОРМА И ПРЕДЕЛ ДИФФУЗИИ В ТРЕХМЕРНЫХ НОСИТЕЛЯХ

Форма и размер матрикса зависят от целей и задач исследований и дальнейшего их использования. На рис. 4 представлены некоторые формы матриц, которые широко применяются в научно-исследовательской деятельности в направлении тканевой инженерии для медицины и ветеринарии. Наиболее распространенными являются сферические матрицы; часто они имеют простую цилиндрическую или прямоугольную форму, но также встречаются ВКМ в форме пленок, волокон, плоских дисков, тканых дисков, кубов, целых децеллюляризованных органов (см. рис. 4, А, В).

Диаметр сферических матриц составляет от 10 мкм до 5 мм. Считается, что чем меньше частицы матрикса, тем он удобнее для перемешивания в резервуарах и тем больше его поверхность в осажденном слое из-за минимального объема пустот между его частицами. Оптимальным размером для гладких (непористых) микроносителей считается 100 — 300 мкм [10]. Очень узкий предел распределения размеров является наиболее важным для хорошего перемешивания в биореакторе и равномерного осаждения шариков при крупномасштабном культивировании.

Для характеристики волокнистого матрикса важны следующие параметры: диаметр волокон, направление волокон и размер пор между ними (см. рис. 4, С—Е). Диаметр волокна зависит от вязкости и проводимости полимерного раствора. Выравнивание волокна может быть достигнуто путем изменения конструкции коллектора (например, высокоскоростной вращающийся каркас) или с помощью двух проводящих электродов, ко-

торые разделены изолирующим зазором. Размер пор можно регулировать путем совместного прядения полимерных растворов с различной кинетикой распада, (например, поли-ε-капролактон и желатин) или же с помощью многослойного вращения, чтобы создать 3D-матрицы со слоями микроволокон (≈5 мм в диаметре) и нановолокон (≈600 нм в диаметре) (см. рис. 4, I).

Характеристикой микромасштабных губчатых матриц являются пористость, взаимосвязанность пор, размер пор и их геометрия, а также распределение пор по размерам (см. рис. 4, F—H). Следует отметить, что внутренняя архитектура губчатых матриц, изготовленных без образования пор, полностью зависит от процесса изготовления и часто не поддается контролю. Нередко такие материалы содержат изолированные поры, которые ограничивают межклеточные взаимодействия и полную инфильтрацию тканей. Техника порообразования может способствовать формированию более предсказуемой трехмерной микроструктуры со взаимосвязанными порами, но толщина такого матрикса ограничена (менее чем 2 мм). Требуемый каркас на уровне наноструктуры можно получать с помощью обработки поверхности после приготовления полимера (см. рис. 4, J) [10].

Удельная плотность и скорость оседания. Непористые микроносители в реакторах с мешалкой имеют удельную плотность чуть выше, чем питательные среды (1,02 — 1,04 г/см³). Материалы или смеси материалов, используемые для производства макропористых микроносителей, имеют удельную плотность в пределах от 1,04 до 2,5 г/см³. Обычно не плотность, а скорость оседания принято считать более информативным параметром для того, чтобы определить пригодность микроносителя для использования в определенном типе реактора. Это связано с тем, что не только удельная плотность, но и размер, и форма влияют на скорость оседания. Скорость ниже, чем 30 см/мин, не обеспечивает достаточную циркуляцию и перемешивание для эффективного переноса питательных веществ по всему слою носителя [57].

Пористость. Размер пор и пористость матрикса являются важными факторами, которые сильно влияют на колонизацию носителя клетка-

* МТТ — тест, используемый для экспериментальной оценки цитотоксичности потенциально противоопухолевых соединений и основанный на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолия (МТТ-реагента) до голубого кристаллического фармачана, растворимого в диметилсульфоксиде.

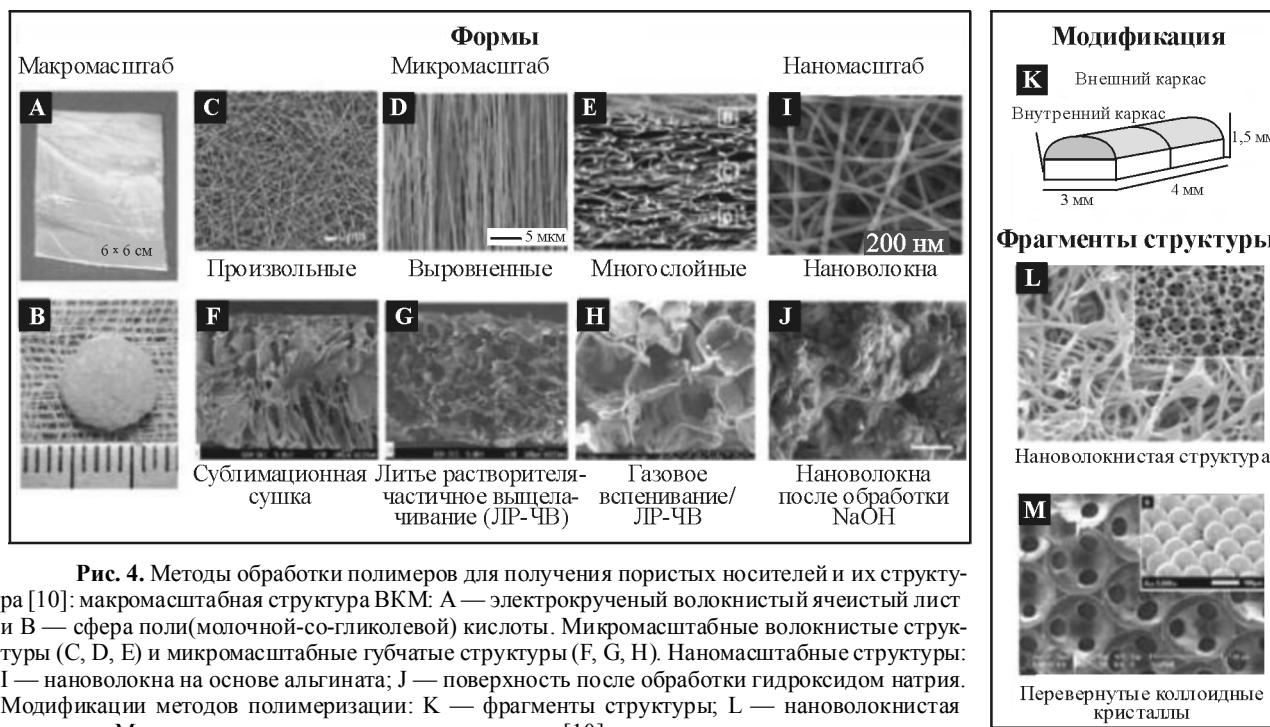


Рис. 4. Методы обработки полимеров для получения пористых носителей и их структура [10]: макромасштабная структура ВКМ: А — электрокрученный волокнистый ячеистый лист и В — сфера поли(молочной-со-гликолевой) кислоты. Микромасштабные волокнистые структуры (С, D, E) и микромасштабные губчатые структуры (F, G, H). Наномасштабные структуры: I — нановолокна на основе альгината; J — поверхность после обработки гидроксидом натрия. Модификации методов полимеризации: К — фрагменты структуры; L — нановолокнистая структура; М — перевернутые коллоидные кристаллы [10]

ми. Большой объем пор стимулирует прикрепление клеток, вмещает в себя большую их массу и способствует неоваскуляризации созданной конструкции, что очень важно для формирования ткани. Размер пор матрикса для конкретного применения зависит от типа клеток и их диаметра. Средняя величина пор подходит для различных клеток размером в диапазоне от 5 до 100 мкм. Перенос питательных веществ и миграция клеток зависят от взаимосвязанности пор и матрикса. *In vivo* клетки, расположенные примерно на расстоянии 200 мкм и более от кровеносного сосуда, весьма подвержены апоптозу или некротической гибели из-за низкого содержания кислорода и недостаточной доступности питательных веществ. В случае использования матриксов эта проблема может быть решена с помощью пористости и взаимосвязанности пор. Тем не менее, возможно закупоривание мелких пор в результате вторжения фиброзной ткани и неспецифической адсорбции белка на начальных этапах посева клеток. Размер пор, морфология и расположение определяют также клеточную инфильтрацию. Одинаково пространственно ориентированные поры и их взаимосвязь обуславливают контролируемое растяжение, стимулируют лучшее прикрепление и пролиферацию клеток на матриксах.

Предпочтительный размер пор является таким, который достаточно мал, чтобы не допускать рост клеток сквозь мембрану матрикса, но все же

достаточно велик, чтобы допустить свободный проход питательных веществ, содержащихся в питательной среде, к нижней поверхности клеточно-матричной конструкции, например, посредством капиллярных сил. Предпочтительные размеры пор — менее 3 мкм (в диапазоне от ~0,1 до ~3 мкм), более предпочтительные — от ~0,2 до ~1 мкм и наиболее предпочтительные — от ~0,4 до ~0,6 мкм. В случае фибробластов кожи человека, к примеру, наиболее эффективный предпочтительный материал для каркаса — поликарбонат, имеющий размеры пор от ~0,4 до ~0,6 мкм. Максимальный размер пор зависит не только от размера клеток, но также и от способности клеток изменять свою форму и проходить через мембрану матрикса. В настоящее время ведутся интенсивные исследования по созданию новых матриксов, которые бы позволяли снимать с них, например, посредством отслаивания, вновь сформированную биомассу [58].

Токсичность. Продуктами деструкции био-разлагаемых матриксов могут быть вещества, включаемые в метаболизм клеток, например, моносахара, молочная, гликолевые и 3-оксимасляные кислоты, либо вещества, не метаболизируемые клетками и тканями. В последнем случае продукты не должны быть токсичными, а их концентрация в кровяном русле не должна превышать предельно допустимый уровень. В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биодегради-

руемым природным (биологическим) полимерам (альгинаты, коллаген, желатин, хитозан) и полиэфирам микробного происхождения (полиоксибутираты и их сополимеры), которые синтезируют прокариотические микроорганизмы в специфических условиях. Природные полимеры расщепляются на более простые соединения, которые выводятся из организма, либо принимают активное участие в биосинтезе, происходящем на клеточном уровне [10].

Прочность. Известно, что прочность матрикса может определять дифференцировку ММСК. Так, мягкие матриксы, подобные по механическим свойствам ВКМ нервной ткани, обладают нейрогенным эффектом; более жесткие — миогенным эффектом; жесткие матриксы, сходные с матриксом костной ткани, стимулируют дифференцировку мезенхимных стволовых клеток в остециты (клетки костной ткани). Интересно, что только в течение первой недели культивирования ММСК на этих матриксах возможно репрограммирование клеток с помощью растворимых факторов; по прошествии же нескольких недель дифференцировка клеток определяется исключительно эластичностью матрикса. Таким образом, физические свойства микроокружения (матрикса) могут определять морфологические изменения клеток и направление их дифференцировки [59].

КОНСТРУИРОВАНИЕ 3D-МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Тканевая инженерия скелетных мышц — перспективное междисциплинарное направление, целью которого, с одной стороны, является восстановление потери мышечной массы, вызванное травматическим повреждением, врожденным дефектом или абляцией опухоли. С другой стороны, не менее перспективным является направление по выращиванию клеток мышечной ткани *in vitro*, например, цельных фрагментов мышечной ткани сельскохозяйственных животных в биореакторе, для дальнейшего использования в пищевой биотехнологии [60].

В последние годы различными исследовательскими группами из разных стран мира были представлены методы создания скелетной мышечной ткани *in vitro*, которая была способна сокращаться. Конечно, пока преждевременно сравни-

вать нативную мышечную ткань и мышечную ткань, выращенную *in vitro*, но вышеупомянутый эксперимент — это несомненно важный шаг в будущее. В предварительных исследованиях нами были выделены и охарактеризованы клеточные популяции с фенотипом, подобным ММСК, из КМ и ЖТ КРС. Установлено, что ММСК, выделенные как из КМ, так и из ЖТ КРС, способны формировать клетки жировой, костной и мышечной тканей при культивировании в индукционных средах *in vitro* [3, 61]. Изучен фракционный состав ее белков и аминокислотный состав. Фракционный состав белков клеточной биомассы несколько отличается от состава, характерного для говядины. Это связано с отсутствием в биомассе соединительной и жировой ткани, а также некоторых белковых фракций. Стоит также отметить наличие фракций многих важных полноценных белков мышечной ткани (актин, миозин) в полученной биомассе. Результаты определения аминокислотного состава биомассы свидетельствуют о ее сходстве с мышечной тканью говядины, а также о ее перспективности в качестве основного компонента для создания пищевых композиций [60].

Ведутся работы по разработке 3D-моделей мышечной ткани с целью лучшего понимания ее механических характеристик и для замены поврежденных мышц в регенеративной терапии [62]. Dennis et al. [63] и Kosnik et al. [64] предложили технику получения 3D-мышечной ткани посредством сокультивирования мышечных и крысиных миобластов и линии фибробластов 10T_{1/2}. Для всех типов клеток “миоид”^{*} формировался посредством диссоциации монослоя клеток, полученного при сокультивировании, от субстрата Sylgard (полидиметилсилоксан). Миоид имел гораздо большее содержание ВКМ по сравнению с нативной скелетной мышечной тканью за счет присутствия фибробластов.

Kamelger et al. [65] сравнили различные матриксы и показали, что крысиные миобласты могут сливаться *in vivo* и образовывать васкуляризованные многоядерные миотубы. Флюоресцентно окрашенные крысиные миобласты высевали на матриксы из полигликолевой кислоты (ПК), а также параллельно суспендировали в альгинате. Специальные пористые капсулы на силиконовых листах вводили подкожно крысам. Через две недели силиконовые листы удаляли, а матриксы на основе ПК с миобластами были имплантированы в

* Миоид — трехмерная конструкция скелетной мышечной ткани, полученная при сокультивировании мышечных и крысиных миобластов и линии фибробластов 10T_{1/2}.

предварительно введенные под кожу капсулы. Спустя четыре недели образцы отбирали и исследовали с помощью окрашивания гематоксилином и эозином и флуоресцентной микроскопии. Все капсулы были хорошо васкуляризированы. Имплантированные миобласты формировали многоядерные мышечные трубки. Это исследование показало, что миобласты, инокулированные в матриксы на основе различных биоматериалов, могут быть успешно пересажены в подготовленные васкуляризированные капсулы. Такие же результаты были получены в аналогичных экспериментах с использованием гидрогелей, изготовленных из гилуруновой кислоты.

В работах Saxena et al. [66] миобласты, полученные от новорожденных крыс линии *Fisher CDF-F344*, высевали на матриксы в виде сетки на основе ПК и имплантировали в сальник сингенных взрослых крыс той же линии. Тест-животных умерщвляли на 30-е и 45-е сутки после трансплантации, и полимерные конструкции с клетками собирали для морфологического анализа. При иммуногистохимическом окрашивании был детектирован положительный результат на присутствие таких маркеров как α -саркомерический актин и десмин скелетных мышц. Была продемонстрирована васкуляризация всего матрикса. Следовательно, миобласты, абсорбированные на биополимерных матриксах могут быть успешно трансплантированы в подготовленные высоко васкуляризированные капсулы.

Другим возможным матриксом для тканевой инженерии мышц является бесклеточная (ацеллюлярная) скелетная мышечная ткань. Для этого исходную ткань обрабатывают детергентным раствором с целью удаления собственных клеток. В результате сохраняется только каркас, представляющий из себя готовый ВКМ. Этот прием используется для инженерии мочевого пузыря, трахеи, почки и др. [67].

В работе Engler et al. [59] показана зависимость скорости слияния миобластов мышцы линии C_2C_{12} от гибкости и твердости матрикса. Миобласты культивировали на полимерных гелях различной упругости, покрытых коллагеном (1 мг/мл). Установлено, что исчерченность миозин/актин возникает только в гелях с твердостью $E \approx 12$ кПа, характерной для нормальной мышцы.

Huang et al. в работе [68] описали технологию приготовления геля на основе фибрина. Чашки Петри покрывали 1,5 мл раствора Sylgard (полидиметилсилоксан). Затем сверху с помощью 10 булавок из нержавеющей стали диаметром 0,1 мм прикрепляли полоски шелка. Далее чашки полнос-

тью покрывали питательной средой, содержащей 10 ед/мл тромбина. Затем добавляли фибриноген (200 мкл, 20 мг/мл) и спустя 10 мин получали гель (фибриногель). В работе было показано, что крысиние миобласты линии *Fisher 344*, нанесенные на фибриногель, дифференцировались и формировали миотубы, которые генерировали максимальную силу сокращения $329 \pm 26,3$ мкН и тетаническую силу (сила определенного мышечного сокращения) $805,8 \pm 55$ мкН. Кроме того, выращенные методами тканевой инженерии мышцы показали нормальные размеры и физиологические функции, такие как длина, натяжение мышцы и сила мышцы в зависимости от частоты раздражений.

В работе [69] были изучены белок фиброин, полученный из шелковых желез личинок *Antheraea mylitta* (AM), и из шелковых желез кокона *Bombyx mori* (BM). 2%-ные растворы фиброина (AM и BM) заливали в форму, замораживали при -20° , затем лиофилизовали и получали трехмерные пористые матриксы диаметром 13 мм и толщиной 2 мм. Покровные стекла (диаметр 12 мм) помещали в 24-луночные планшеты, промывали один раз 70%-ным этанолом и дважды 100%-ным этанолом в течение 3 мин. Высушенные на воздухе покровные стекла инкубировали со 100 мкл раствора фибронектина (10 мкг/мл) в ФСБ в сочетании с 0,5%-ным раствором фиброина шелка в ФСБ или с 1%-ным раствором желатина в воде в течение 2 ч при 37° . Затем покровные стекла в течение 30 мин подвергали воздействию УФ лучей прежде, чем высевали на них вентрикулярные кардиомиоциты 3-дневных крыс. Тест на адгезию кардиомиоцитов показал, что даже спустя 6 ч значительно большее число клеток прикрепляются к субстрату фиброина шелка AM, чем BM, и почти не было детектировано различий в адгезии на желатиновом субстрате, покрытом фибронектином. Было установлено, что фиброин шелка AM способствует эффективной адгезии кардиомиоцитов, не влияя при этом на их ВКМ. Кардиомиоциты, растущие на фиброине шелка AM, продуцировали коннексин 43 (мембранный белок из семейства белков щелевых контактов). Из полученных результатов следует вывод, что 3D-каркасы из фиброина шелка AM могут быть пригодны для создания матриксов для регенеративной медицины болезней сердца.

Cheema et al. [70] провели исследования раннего развития скелетных мышц путем посева клеток гладкой мускулатуры, выделенных из мочевого пузыря кролика, на 3D-коллагеновые решетки и наблюдали за их дифференцировкой *in vitro* — слиянием миобластов и формированием мышечных трубок. Кроме того, миобласты совместно

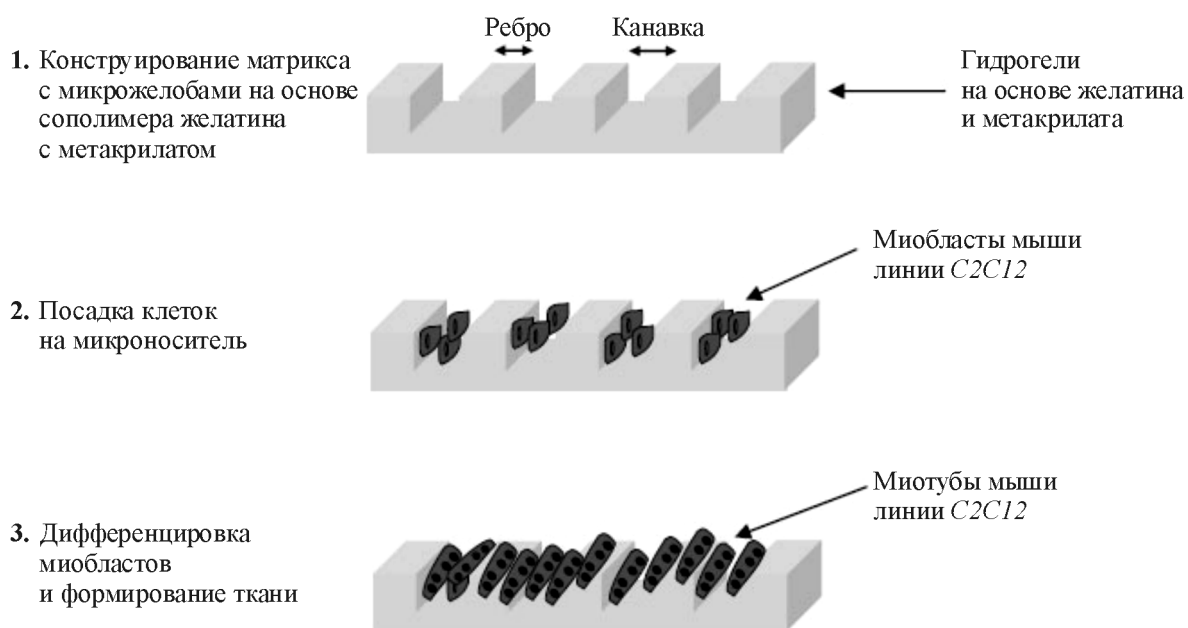


Рис. 5 Схема конструирования мышечных волокон на матрице на основе сополимера желатина с метакрилатом (GelMA) [71]

культивировали с фибробластами кожи человека в специально созданной трехмерной конструкции мышечной ткани. Были установлены основные различия в формировании взаимодействия между скелетными миобластами, кожными фибробластами и гладкомышечными клетками в 3D-матриксе на основе геля коллагена. Коллагеновые решетки были установлены в формы из силиконового эластомера (2,5×7,3×1,5 см) между двумя полиэтиленовыми сетками на основании из брусков. Для приготовления решеток из коллагена 0,5 мл 10-кратного раствора среды Игла MEM добавляли к 4 мл коллагена 1-го типа, полученного из крысиного хвоста, нейтрализовали 5 M NaOH, пока цвет не изменился с желтого на розовый. Полученный гель вводили в суспензию клеток. Затем к 5 мл геля добавляли 5 млн. клеток, суспендировали в 0,5 мл питательной среды DMEM и помещали на основание из брусков. Полученную конструкцию выдерживали в CO₂-инкубаторе. Этот матрикс был разработан для воспроизводства органоида, в котором можно измерить различия в генерации силы мышечного сокращения при слиянии скелетных миобластов с образованием мышечных трубок в коллагеновом геле. В этом случае клетки были способны генерировать ВКМ, необходимый для структурной поддержки. Очень важно и примечательно, что, используя подходящие условия культивирования и субстраты для роста, мышечная ткань, сформировавшаяся на данном матриксе *in vitro*, проявила подобные нативным характе-

ристики в области морфологии, дифференцировки и даже сократительной функции.

Группой ученых из разных стран мира (Япония, Швеция, Великобритания, США, Франция) [71] были получены и изучены гидрогели на основе сополимера желатина с метакрилатом (GelMA) в форме микрожелобов в качестве матрикса для роста мышечной ткани (рис. 5). 80%-ный GelMA получали путем смешивания 8 мл ангидрида метакриловой кислоты с 10 г желатина кожи свиньи типа А в 100 мл физиологического раствора, с добавлением фосфатов и без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ (ФСБ-2). Смесь перемешивали при температуре 50° в течение 3 ч. Реакцию останавливали путем разбавления смеси четырехкратным теплым (40°) ФСБ-2. Полученную смесь подвергали диализу против дистиллированной воды в течение 1 нед при 40°, а затем лиофилизировали. Раствор, содержащий 20% GelMA и 1% фотоинициатора в ФСБ-2, выдерживали при 70° до полного растворения GelMA. Затем образовавшийся гель GelMA помещали в стандартные культуральные матрасы, либо на куски стекла и с помощью специальных силиконовых заготовок формовали микрожелоба двух различных типов: первый вариант с чередованием 100 мкм канавка/50 мкм ребро, второй вариант — 100 мкм канавка/100 мкм ребро (см. рис. 5).

Было установлено, что на третьи сутки культура миобластов мышцы линии C2C12, которые выращивали в микрожелобах из гидрогеля на основе GelMA, была более упорядоченной, чем миоблас-

ты, которые культивировали без гидрогеля. Также было отмечено, что размер ребра существенно не влиял на расположение и форму миобластов мышцы линии *C2C12*. Однако на микрожелобах с большим размером ребра выросло большее количество мышечных трубок, чем на микрожелобах с меньшим размером ребра. Было также изучено электрическое воздействие на клетки, которое способствовало лучшему выравниванию и упорядочению пространственной ориентации миобластов, а также увеличивало диаметр полученных мышечных трубок.

На основании проведенного анализа литературных данных и учитывая конечную цель проводимых нами исследований можно заключить, что необходимо проведение дальнейших исследований по получению фрагментов мышечной ткани с использованием подходящих матриц для нужд клеточной и пищевой биотехнологии. Известно, что метаболические потребности клеток, растущих на трехмерных конструкциях, существенно выше, чем у клеток в плоских монослоях, выращенных в статических условиях в жидких средах. Для масштабного трехмерного культивирования необходимы биореакторы, которые поддерживали бы необходимые условия для культивирования клеток, в частности, обеспечение их газом/питательными веществами и основными факторами для поддержания жизнеспособности.

В настоящее время методы клеточной биологии приобрели приоритетное развитие в клинической медицине, ветеринарии, биотехнологии. С помощью этих методов стало возможно получать клетки со специализированными свойствами, которые могут быть использованы для улучшения или восстановления функций тканей или органов, а также продуцировать полноценный белок животного происхождения гуманными способами. Клеточные технологии наряду с успехами физико-химических наук составили основу для развития тканевой инженерии и пищевой биотехнологии. Появление новых материалов и их сочетание с уникальными свойствами выделенных или модифицированных *in vitro* клеток позволило сделать определенные прорывы в области регенеративной медицины, ветеринарии, трансплантологии и биотехнологии. Анализ литературных данных, проведенный в данном обзоре, показал, что несмотря на разнообразие природных и синтетических носителей универсального матрикса не существует. При его выборе в каждом конкретном случае необходимо ориентироваться на задачи исследования и воз-

можности дальнейшего применения полученных структур.

К своему 125-летию (2005 г.) американский научный журнал «Science» опубликовал список из 125 величайших загадок, которые предстоит решить современной науке. Вопрос о стволовых клетках, регенерации и выращивании органов и тканей находится в этом списке на восьмом месте. За последние пять лет исследователи сделали множество открытий, касающихся клинического применения клеточных технологий и тканевой инженерии. Так, сейчас ученые уже применяют искусственно выращенную кожу, трахеи, зубы, с помощью костных трансплантатов предпринимаются попытки лечения костных переломов и т.д. На сегодняшний день проводятся исследования в области применения указанных подходов в пищевой биотехнологии, что вселяет надежду на их скорое применение в промышленных масштабах.

Получено 27.04.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Friedenstein, A.J.* The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guineapig bone marrow and spleen cells/ A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhjan, K.S. Lalykina// *Cell Tissue Kinet.* — 1970. — V. 3. — P. 393—403.
2. *Campagnoli, C.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow/ C. Campagnoli, I.A. Roberts, S. Kumar, P.R. Bennett, I. Bellantuono, N.M. Fisk// *Blood.* — 2001. — V. 98. — P. 2396—2402.
3. *Волкова И.М.* Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота/ И.М. Волкова, Е.В. Викторова, И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин// *Сельскохозяйств. биол.* — 2012. — № 2. — С. 32—38.
4. *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// *Cytotherapy.* — 2006. — V. 8. — P. 315—317.
5. *Russell, K.C.* Cell-surface expression of neuron-glia antigen 2 (NG2) and melanoma cell adhesion molecule (CD146) in heterogeneous cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells/ K.C. Russell, H.A. Tucker, B.A. Bunnell, M. Andreeff, W. Schober, A.S. Gaynor, K.L. Strickler, S. Lin, M.R. Lacey, K.C. O'Connor// *Tissue Eng.* — 2013. — V. 19 (N 19 and 20). — P. 2253—2266.
6. *Le Blanc, K.* Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells // *Cytotherapy.* — 2003. — V. 5. — N 6. — P. 485—489.
7. *Beyth, S.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness/ S. Beyth, Z. Borovsky, D. Mevorach// *Blood.* — 2005. — V. 105. — N 5. — P. 2214—2219.

8. *Dazzi, F.* The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis/ *F. Dazzi, R. Ramasamy, S. Glennie, S.P. Jones, I. Roberts*// *Rev. Blood.* — 2006. — V. 20. — P. 161—171.
9. *Siegel, G.* The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells/ *G. Siegel, R. Shaffer, F. Dazzi*// *Transpl.* — 2009. — V. 87. — N 9. — P. 45—49.
10. *Lee, J.* Three-dimensional cell culture matrices: state of the art/ *J. Lee, M.J. Cuddihy, N.A. Kotov*// *Tissue Eng. Part B Rev.* — 2008. — V. 14. — N 1. — P. 61—86.
11. *Greiner, A.M.* Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies / *A.M. Greiner, B. Richter, M. Bastmeyer* // *Macromol. Biosci.* — 2012. — V. 12. — N 10. — P. 1301—1314.
12. *Coutu, D.L.* Three-dimensional porous scaffolds at the crossroads of tissue engineering and cell-based gene therapy. / *D.L. Coutu, A.M. Yousefi, J. Galipeau* // *J. Cell Biochem.* — 2009. — V. 108. — N 3. — P. 537—546.
13. *Schindler, M.* Living in three dimensions. 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine / *M. Schindler, A. Nur-E-Kamal, I. Ahmed, J. Kamal, H.Y. Liu, N. Amor, A.S. Ponery, D.P. Crockett, T.H. Grafe, H.Y. Chung, T. Weik, E. Jones, S. Meiners*// *Cell Biochem. Biophys.* — 2006. — V. 45. — P. 215—227.
14. *Pallela, R.* Biophysical evaluation of chitosanhydroxyapatite-marine sponge collagen composite for bone tissue engineering/ *R. Pallela, J. Venkatesan, V.R. Janapala, S.K. Kim*// *J. Biomed. Mater. Res.* — 2012. — Part A. — P. 486—495.
15. *Qu, J.* Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote astrocyte migration/ *J. Qu, D. Wang, H. Wang, Y. Dong, F. Zhang, B. Zuo, H. Zhang*// *J. Biomed. Mater. Res. A.* — 2013. — V. 101. — N 9. — P. 2667—2678.
16. *Mauney, J.R.* Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during *ex vivo* expansion/ *J.R. Mauney, V. Volloch, D.L. Kaplan* // *Biomaterials.* — 2005. — V. 26. — N 31. — P. 6167—6175.
17. *Baptista, P.M.* Whole organ decellularization — a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering/ *P.M. Baptista, G. Orlando, S.H. Mirmalek-Sani*: *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* — Piscataway, NJ: IEEE Service Center, 2009. — P. 6526—6529.
18. *Ho, Y.C.* Heparin-functionalized chitosan-alginate scaffolds for controlled release of growth factor/ *Y.C. Ho, F.L. Mi, H.W. Sung, P.L. Kuo*// *Int. J. Pharm.* — 2009. — V. 376. — P. 69—75.
19. *Ifuku, S.* Chitin and chitosan nanofibers: preparation and chemical modifications // *Molecules (Basel, Switzerland).* — 2014. — V. 19. — N 11. — P. 18367—18380.
20. *Калинкевич О.В.* 3D-скаффолды на основе хитозана для культивирования клеток и тканевой инженерии/ *О.В. Калинкевич, А.Н. Калинкевич, А.М. Скляр, М.В. Погорелов, И.Н. Поодубный, В. В.Стариков, С.Н. Данильченко*// *Пробл. криобиол.* — 2012. — Т. 22. — № 2. — С. 182—185.
21. *Бакунова Н.В.* Пористые хитозановые матриксы, армированные биоактивными соединениями кальция для восстановления костной ткани/ *Н.В. Бакунова, С.М. Баринов, В.С. Комлев, В.В. Смирнов*// *Науч. ведомости. Сер.: Математика. Физика.* — 2011. — Т. 11(106). — С. 173—178.
22. *Сергеева Н.С.* Роль аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в тканеинженерных конструкциях на основе натуральных кораллов и синтетических биоматериалов при замещении костных дефектов у животных/ *Н.С. Сергеева, Г.А. Франк, И. К. Свиридова, В.А. Кирсанова, С.А. Ахмедова, А.И. Антохин*// *Клет. трансплантол. ткан. инж.* — 2009. — Т. IV(4). — С. 56—64.
23. *Berry, J.F. Heckel, M.G., Hoskins, V.W.* Vacuum operated medicine dispenser// *European Patent № 0705215, A1 PCT/US1994/007014.* 1994.
24. *Greco, R.* Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation via collagen matrix/ *R. Greco, J. Icono, H. Ehrlich*// *J. Cell Physiol.* — 1998. — V. 177. — P. 465—473.
25. *Рахматуллин Р.Р., Поздняков О.А.* Биопластический материал// *Патент РФ № 2367476, A61L27/44, B82B1/00.* 2009.
26. *Nusgens, B.* Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix *in vitro*/ *B. Nusgens, C. Merrill, C. Lapiere, E. Bell*// *Coll. Relat. Res.* — 1984. — V. 4(5). — P. 351—363.
27. *Wang, Y.* Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich/ *Y. Wang, H.L. Liu, H.T. Guo, H.W. Wen, J. Liu*// *World J. Gastroenterol.* — 2004. — V. 10. — N 5. — P. 699—702.
28. *Yoheno, K.* Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in 3-dimensional collagen gel cultures/ *K. Yoheno, S. Ohno, K. Tanimoto, K. Honda, N. Tanaka, T. Doi, T. Kawata, E. Tanaka, S. Kapila, K. Tanne*// *J. Biomed. Mat. Res. A.* — 2005. — V. 75(3). — P. 733—741.
29. *Urciuolo, A.* Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration/ *A. Urciuolo, M. Quarta, V. Morbidoni*// *Nat. Commun.* — 2013. — V. 4. — P. 1964—1989.
30. *Elliott, N.T.* Review of three-dimensional *in vitro* tissue models for drug discovery and transport studies/ *N.T. Elliott, F. Yuan*// *J. Pharm. Sci.* — 2011. — V. 100. — P. 59—74.
31. *Teplyashin, A.S.* Engineering cartilage-like tissue using adipose derived adult stem cells and collagen scaffolds/ *A.S. Teplyashin, S.V. Korjikova, S.Z. Sharifullina, N.I. Chupikova, M.S. Rostovskaya, N. Yu. Vasyunina, I.P. Savchenkova*// *Tissue Eng.* — 2006. — V. 12. — N 4. — P. 1117—1121.
32. *Севастьянов В.И.* Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины // *Регенерат. мед. и клет. технол.* — 2014. — Т. XVI(3). — С. 93—108.
33. *Nomura, Y.* Use of shark collagen for cell culture and zymography/ *Y. Nomura, N. Kitazume*// *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2002. — V. 66(12). — P. 2673—2676.
34. *Bae, I.* Characteristics of a self-assembled fibrillar gel prepared from red stingray collagen/ *I. Bae, K. Osatomi, A. Yoshida*// *Fish Sci.* — 2009. — V. 75. — P. 765—770.
35. *Sivakumar, P.* The composition and characteristics of skin and muscle collagens from a freshwater catfish grown in biologically treated tannery effluent water/ *P. Sivakumar, R. Arichandran, L. Suguna, M. Mariappan, G. Chandrakasan*// *J. Fish Biol.* — 2000. — V. 56. — P. 999—1012.

36. Kumar, K.V. Application of frog (*Rana tigerina Daudin*) skin collagen as a novel substrate in cell culture/ K.V. Kumar, K.P. Sai, M. Babu// J. Biomed. Mater. Res. — 2002. — V. 61(2). — P. 197—202.
37. Song, E. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility/ E. Song, K.S. Yeon, T. Chun, H.J. Byun, Y.M. Lee// Biomaterials. — 2006. — V. 27. — N 15. — P. 2951—2961.
38. Баринов С.М., Комлев В.С., Фадеева И.В., Федотов А.Ю., Фомин А.С. Пористый композиционный материал на основе хитозана и желатина для заполнения костных дефектов// Патент РФ № 2412711, А61К31/722, А61Л33/06, А61L27/56, F61L27/12, А61L27/26. 2011.
39. Орлова А.А. Влияние концентрации желатина в составе композитных матриц на основе фибрина шелка на адгезию и пролиферацию клеток линии мышечных эмбриональных фибробластов/ А.А. Орлова, М.С. Котлярова, В.С. Лавренов, С.В. Волкова, А.Ю. Архипова// Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2014. — № 7. — С. 98—102.
40. Богдан В.Г. Выбор внеклеточной матрицы многокомпонентного биологического трансплантата с мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани для пластики обширных дефектов передней брюшной стенки/ В.Г. Богдан, М.М. Зафранская, Ю.М. Гаин// Военная мед. — 2014. — Т. 1. — С. 88—93.
41. Rajangam, T. Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications / T. Rajangam, S.S.A. An// Int. J. Nanomed. — 2013. — V. 8. — P. 3641—3662.
42. Rajangam, T. Development of fibrinogen microspheres as a biodegradable carrier for tissue engineering/ T. Rajangam, H.J. Paik, S.S.A. An// BioChip J. — 2011. — V. 5(2). — P. 175—183.
43. Vepari, C. Silk as a biomaterial/ C. Vepari, D.L. Kaplan// Prog. Polym. Sci. — 2007. — V. 32. — N 8—9. — P. 991—1007.
44. Rockwood, D.N. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin/ D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan// Nat. Protoc. — 2011. — V. 6. — N 10. — P. 1612—1631.
45. Богуш В.Г. Характеристика биодegradируемых клеточных микро- и макроносителей на основе рекомбинантного спидроина/ В.Г. Богуш, Л.И. Давыдова, М.М. Мойсенович, К.В. Сидорук, А.Ю. Архипова, Д.Г. Козлов, И.И. Агапов, М.П. Кирпичников, В.Г. Дебабов// Биотехнология. — 2014. — № 1. — С. 52—61.
46. Huang, G. Engineering three-dimensional cell mechanical microenvironment with hydrogels/ G. Huang, L. Wang, S. Wang, Y. Han, J. Wu, Q. Zhang, F. Xu, T.J. Lu// Biofabrication. — 2012. — V. 4. — P. 1—12.
47. Лозинский В.И. Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения — полимерные криогели // Изв. Акад. наук. Сер. хим. — 2008. — № 5. — С. 1—18.
48. Petrenko, Yu.A. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells/ Yu.A. Petrenko, R.V. Ivanov, A.Yu. Petrenko, V.I. Lozinsky// J. Mater. Sci. Mater. Med. — 2011. — V. 22. — P. 1529—1540.
49. Wen, C. Fabrication of novel metal alloy foams for biomedical applications/ C. Wen, Y. Yamada, P. Hodgson// Mater. Forum. — 2005. — V. 29. — P. 274—278.
50. Buehler, W. J., Wiley, R. C. Nickel-based alloys // Patent US N 3174851. 1965.
51. Зубопротезная техника: учебник для медицинских училищ и колледжей [Под ред. М.М. Расулова, Т.И. Ибрагимова, И.Ю. Лебеденко]. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 384 с.
52. Nemir, S. Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity/ S. Nemir, J.L. West// Ann Biomed Eng. — 2010. — V. 38(1). — P. 2—20.
53. Cheung, H.-Y. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development/ H.-Y. Cheung, K.-T. Lau, T.-P. Lu, D. Hui// Composites Part B. — 2007. — V. 38. — P. 291—300.
54. Teplyashin, A.S. *In vitro* cartilage formation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in OPLA scaffolds/ A.S. Teplyashin, S.V. Korjikova, N.I. Chupikova, S.Z. Sharifullina, M.S. Rostovskaya, N. Yu. Vasyunina, I.P. Savchenkova// Tissue Eng. — 2006. — V. 12. — N 4. — P. 1090—1095.
55. Zdrahala, R.J. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future/ R.J. Zdrahala, I.J. Zdrahala// J. Biomater. Appl. — 1999. — V. 14. — P. 67—90.
56. Шишацкая Е.И. Клеточные матрицы из резорбируемых полигидроксиканоатов // Клет. трансплант. ткан. инж. — 2007. — Т. II(2). — С. 68—75.
57. Microcarrier Cell Culture. Principles and Methods: GE Healthcare. — 2005. — P. 173.
58. Guo, Z. Effects of particle morphology, pore size and surface coating of mesoporous silica on Naproxen dissolution rate enhancement/ Z. Guo, X.M. Liu, L. Ma, J. Li, H. Zhang, Y.P. Gao, Y. Yuan// Colloids Surf B Biointerfaces. — 2013. — V. 101. — P. 228—235.
59. Engler, A.J. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments/ A.J. Engler, A.M. Griffin, S. Sen, C.G. Bönnemann, H.L. Sweeney, D.E. Discher// J. Cell Biol. — 2004. — V. 166. — N 6. — P. 877—887.
60. Рогов И.А. Мясо *in vitro* как перспективный источник полноценного белка/ И.А. Рогов, А.Б. Лисицын, К.Г. Таранова, И.М. Волкова// Все о мясе. — 2013. — № 4. — С. 22—25.
61. Рогов И.А. Дифференцировка мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота, в клетки мышечной ткани *in vitro*/ И.А. Рогов, И.М. Волкова, К.В. Кулешов, И.П. Савченкова// Сельскохозяйств. биол. — 2012. — № 6. — С. 66—72.

62. Stern-Straeter, J. Advances in skeletal muscle tissue engineering/ J. Stern-Straeter, F. Riedel, G. Bran, K. Hörmann, U.R. Goessler// *In vivo*. — 2007. — V. 21. — P. 435—444.
63. Dennis, R.G. Excitability and contractility of skeletal muscle engineered from primary cultures and cell lines/ R.G. Dennis, P.E. Kosnik 2nd, M.E. Gilbert, J.A. Faulkner// *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2001. — V. 2. — P. 288—295.
64. Kosnik, P.E. Functional development of engineered skeletal muscle from adult and neonatal rats/ P.E. Kosnik, J.A. Faulkner, R.G. Dennis// *Tissue Eng.* — 2001. — V. 5. — P. 573—584.
65. Kamelger, F.S. A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model/ F.S. Kamelger, R. Marksteiner, E. Margreiter, G. Klima, G. Wechselberger, S. Hering, H. Piza// *Biomaterials.* — 2004. — V. 9. — P. 1649—1655.
66. Saxena, A.K. Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers: preliminary studies/ A.K. Saxena, J. Marler, M. Benvenuto, G.H. Willital, J.P. Vacanti// *Tissue Eng.* — 1999. — V. 5(6). — P. 525—532.
67. Teodori, L. Native extracellular matrix: a new scaffolding platform for repair of damaged muscle/ L. Teodori, A. Costa, R. Marzio, B. Perniconi, D. Coletti, S. Adamo, B. Gupta, A. Tarnok// *Front Physiol.* — 2014. — V. 5. — P. 218—227.
68. Huang, Y.-C. Rapid formation of functional muscle *in vitro* using fibrin gels/ Y.-C. Huang, G.R. Dennis, L. Larkin, K. Baar// *J. Appl. Physiol.* — 2005. — V. 98. — N 2. — P. 706—713.
69. Patra, C. Silk protein fibroin from *Antheraea mylitta* for cardiac tissue engineering/ C. Patra, S. Talukdar, T. Novoyatle-va, S.R. Velagala, C. Mühlfeld, B. Kundu, S.C. Kundu, F.B. Engel // *Biomaterials.* — 2012. — V. 33(9). — P. 2673—2680.
70. Cheema, U. 3-D *in vitro* model of early skeletal muscle development/ U. Cheema, S.Y. Yang, V. Mudera, G.G. Golds-pink, R.A. Brown// *Cell Motil. Cytoskeleton.* — 2003. — V. 54(3). — P. 226—236.
71. Hosseini, V. Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate/ V. Hosseini, S. Ahadian, S. Ostrovidov, G. Camci-Unal, S. Chen, H. Kaji, M. Ramalingam, A. Khademhosseini// *Tissue Eng. Part A.* — 2012. — V. 18. — N 23—24. — P. 2453—2465.

I.M. VOLKOVA*, and D.G. KOROVINA

The Kovalenko All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary, 109428, Moscow Russia

e-mail: akoulinairina@mail.ru

Three-dimensional Matrices of Natural and Synthetic Origin for Cell Biotechnology

The review describes the classification, analysis, characteristics and prospects of the application of various types of matrices, of natural or synthetic origin, for cell biotechnology. A particular attention is paid to three-dimensional structures designed on the basis of components of the extracellular matrix (ECM) with multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC). In particular, the authors previously obtained cell populations with a phenotype similar to MMSC from farm animal bone marrow (BM) and adipose tissue (AT). A comparative analysis of the properties and features of the derived cellular populations was performed. It was established that MMSC isolated from BM and AT, were capable of formation fatty, bone and muscle tissue cells when cultured in induction media *in vitro*. Therefore, obtaining by myogenesis of farm animals muscle tissue analogs using the three-dimensional MMSC culturing on a porous matrix is a promising research direction for the needs of regenerative medicine, veterinary medicine, and cell and food biotechnology.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC), bone marrow, myodifferentiation, *in vitro*, matrix, 3D cultivation, 3D scaffolds, muscle tissue, cell biotechnology.

* Author for correspondence.