

УДК 616.831-089.819.843:677.021.122.6

БИОСОВМЕСТИМЫЕ МАТРИКСНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ТЕРАПИИ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ И ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Ю.С. Хотимченко^{1,2}, А.В. Щерблыкина¹, В.В. Кумейко^{1,2}

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17), ²Дальневосточный федеральный университет (690950 г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

Ключевые слова: биосовместимые полимеры, матриксные имплантаты, травмы мозга, нейродегенеративные заболевания.

Обзор современных исследований и разработок в области создания биосовместимых имплантируемых материалов для терапии дегенеративных и посттравматических патологий центральной нервной системы. Проведен критический анализ материалов и их компонентов на основе природных и синтетических полимеров, применение которых в качестве матриксных имплантатов может способствовать восстановлению целостности поврежденного мозга, осуществлению заместительных и трофических функций, индукции репаративных процессов за счет внутренних и имплантируемых клеточных источников. Современное состояние биомедицинского материаловедения и тканевой инженерии для нужд нейротрансплантологии охарактеризовано в форме анализа способности материалов имитировать структуры и функции естественного внеклеточного матрикса, индуцировать нейрогенез и восстановление проводниковых функций нервной системы, а также способности материалов подвергаться контролируемой биодеградации с последующим замещением тканевыми структурами организма.

Средства лекарственной терапии, рекомендуемые при лечении нейродегенеративных заболеваний и травм центральной нервной системы, не являются в полной мере эффективными для восстановления пораженных структур и утраченных функции мозга, особенно при значительных тканевых повреждениях, сопровождающихся дегенерацией клеток и проводящих путей. Одной из перспективных технологий здесь следует признать применение имплантатов, обладающих достаточной биосовместимостью и способствующих реконструкции поврежденного участка мозга. В качестве имплантатов рассматривают биосовместимые материалы на основе природных и синтетических полимеров; клетки нервной ткани и их предшественники – шванновские, обкладочные обонятельные, стволовые клетки различного происхождения, а также биополимерно-клеточные (искусственные тканевые) имплантаты, являющиеся комбинацией имплантатов двух первых видов. Полимерные материалы представляют собой структуры, которые имитируют строение и функции естественного внеклеточного матрикса. Создаваемые (разрабатываемые) матриксные материалы изготавливают в виде гидрогелей, лиофильно высушенных губок, волокон, а также рассматривают сочетания этих форм. Матриксные имплантаты выполняют каркасную, заполняя место дефекта, и трофическую функции, поддерживают жизнеспособность,

стимулируют регенерацию, размножение и дифференцировку клеток, а также могут служить системой адресной доставки лекарств. Основными требованиями, предъявляемыми к матриксным материалам для реконструктивной терапии повреждений нервной системы, являются:

- 1) биосовместимость – материалы должны быть иммунологически инертны, не вызывать воспаления;
- 2) контролируемая биодеградация, соизмеримая со скоростью регенерации нервной ткани;
- 3) способность поддерживать адгезию, миграцию нервных клеток и аксональный рост;
- 4) способность контролировать размножение и дифференцировку имплантируемых клеток посредством взаимодействия с их рецепторами и индукции соответствующих сигнальных путей;
- 5) способность модулировать формирование глиомезодермального рубца и контролировать миграцию, адгезию и рост клеток мезодермального происхождения, влияющих на эффективность нейрорепаративных процессов.

Разработка материалов для нейротрансплантации базируется на фундаментальных знаниях, накопленных в ходе многочисленных исследований травматической болезни мозга, дегенеративных изменений в нервной системе и механизмов восстановления проводниковых функций, в которых задействованы процессы аксонального роста, пролиферации и миграции клеток нейроглии, механизмы формирования глиомезодермального рубца, а также процессы васкуляризации поврежденных участков мозга. Существенный вклад в эту важную область знания был внесен российской школой гистофизиологов и морфологов во главе с П.А. Мотавкиным. Начиная со второй половины 50-х годов XX века П.А. Мотавкиным и его учениками исследуются процессы дегенерации и восстановления в центральной и периферической нервной системе [2, 3]. Получены важнейшие данные об особенностях формирования бунгнеровских лент, сроках и механизмах их восстановления, в которых важными составляющими являются готовность бунгнеровских лент и активный рост аксонов с их участием. Коллективом научной школы исследованы фундаментальные особенности гистофизиологии сосудов мозга, механизмы васкуляризации при репаративных процессах в центральной нервной

Кумейко Вадим Владимирович – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии ИБМ ДВО РАН, доцент кафедры клеточной биологии ДВФУ; e-mail: vkumeiko@yandex.ru

системе [4–7]. Таким образом, был подготовлен важнейший пласт информации, которая в настоящий момент является основой для разработки принципов реконструктивной терапии при дегенеративных и посттравматических заболеваниях нервной системы. Исследования применения полимеров и клеток для нейротрансплантации, несомненно, должны оценивать участие естественных репаративных процессов во взаимодействии с имплантируемыми материалами, которые призваны ускорять и обеспечивать эффективность восстановления.

Ни один из огромного числа природных и искусственных полимеров, перспективных в качестве компонентов имплантируемых материалов для терапии нейродегенеративных заболеваний и травматической болезни мозга, в полной мере не удовлетворяет всем предъявляемым требованиям. Рассмотрим достоинства и недостатки главных претендентов на роль биосовместимых матриксных имплантатов.

Синтетические материалы для реконструкции спинного и головного мозга представлены полимерными матриксами на основе α -гидроксикислот (полимолочная кислота, полигликолевая кислота и их сополимеры), а также метакриламидов – поли-N-2-(гидроксипропил)-метакриламида (РНРМА) и поли-N-2-(гидроксиэтил)-метакриламида (РНЕМА) [18, 44, 50].

Гидрогели на основе РНЕМА активно исследуются как матриксные материалы для реконструктивной терапии при травмах спинного мозга [18]. Модификация полимера за счет присоединения положительно или отрицательно заряженных молекул позволяет регулировать адгезию клеток, стимулирует аксональный рост.

«Нейрогель™» на основе РНММА имплантировали в эксперименте при компрессии спинного мозга через 14 недель после травмы, что приводило к улучшению двигательных функций на 1–3 балла по шкале BBB в течение 12 недель после имплантации [48]. В модели полного пересечения спинного мозга у кошек нейрогель также способствовал уменьшению объема глиального рубца и восстановлению движения в задних конечностях [50].

Все синтетические материалы обладают одним общим преимуществом – возможностью стандартизации свойства, в отличие от природных полимеров, выделение которых из тех или иных источников может каждый раз давать различные результаты. Основным недостатком синтетических материалов является то, что без дополнительных модификаций они не могут поддерживать адгезию, рост клеток и регенерацию аксонов, так как не несут соответствующих лигандов для клеточных рецепторов. Для того чтобы усилить адгезивные свойства, синтетические материалы модифицируют, ковалентно пришивая специфические пептиды. Так, на модели травмы спинного мозга изучена эффективность имплантации нейрогеля с иммобилизованными RGD-пептидами, имплантация которого стимулировала рост аксонов [49]. РНРМА (в том числе модифицированный IKVAV-пептидами)

использовали в реконструктивной терапии травмы головного мозга [11]. Гель способствовал росту аксонов и новообразованию сосудов. Модификация синтетического полимера пептидами ламинина усиливала его регенераторные свойства.

Скорость биodeградации синтетических материалов также представляет собой важную проблему. Имплантаты на основе метакриламида не разрушаются в организме. Скорость деградации полимолочной и полигликолевой кислот, а также их сополимеров можно контролировать за счет соотношения мономеров, но продукты распада изменяют водородный показатель в кислую сторону, что ограничивает количество имплантируемого материала [33].

Недостатки синтетических материалов в качестве имплантатов при травмах центральной нервной системы стимулируют изучение возможности применения природных полимеров. Разрабатываются гели на основе гиалуроновой кислоты – углевода, формирующего аморфное вещество внеклеточного матрикса животных. Гиалуроновую кислоту модифицируют добавлением тиоловых групп, которые затем ковалентно сшивают через поли-(этиленгликоль)-диакрилат. Такие гели поддерживали жизнеспособность и аксональный рост нейронов дорзального ганглия цыпленка [19]. Однако имплантация данных гиалуроновых гелей в область травмы спинного мозга крыс не способствовала его регенерации. Очевидно, что гиалуроновая кислота не инициирует рост аксонов инкапсулированных в нее нейронов. Внедрение гиалуронового геля в область повреждения коры головного мозга крысы ингибировала формирование глиального рубца, могла обеспечивать миграцию клеток внутрь геля, но не поддерживала аксональный рост [12]. Этому недостатка лишены те же гели, модифицированные с помощью иммобилизованных RGD-фрагментов или молекул ламинина [12, 20]. В такие гели проникают не только клетки, но и активно прорастают регенерирующие аксоны. В работе Парка и др. [32] гели на основе гиалуроновой кислоты, модифицированной последовательностью ламинина IKVAV и пептидами, чувствительными к металлопротеиназам, способствовали восстановлению двигательных функций крыс после травмы спинного мозга.

Для того чтобы стимулировать аксоногенез, гиалуроновую кислоту также модифицируют при помощи антител к рецептору Nogo-66. Это нейрональный рецептор, связывающийся с тремя молекулами, ингибирующими аксональный рост (Nogo-A, миелинассоциированный гликопротеин и гликопротеин олигодендроцитов) [22]. В то время как гели на основе немодифицированной гиалуроновой кислоты не стимулировали адгезию и выживание клеток дорзального ганглия, анти-Nogo-66-гиалуроновая кислота поддерживала жизнеспособность клеток в культуре и стимулировала аксональный рост [20]. Гели, модифицированные полилизинном и антителами к Nogo-66 значительно стимулировали ангиогенез и ингибировали формирование глиального рубца в модели травмы спинного мозга [47].

Таким образом, гиалуроновая кислота является хорошим базовым материалом для формирования гелей – основы будущих имплантатов. Однако без введения дополнительных компонентов или химической модификации гиалуронат не способствует регенерации нервной системы. Основным его недостатком, так же как и других природных материалов животного происхождения, является быстрая деградация. В организме животных существует три типа ферментов, расщепляющих гиалуроновую кислоту: гиалуронидаза, β -D-глюкуронидаза и β -N-ацетил-гексозаминидаза [30]. Известно, что продукты деградации гиалуроновой кислоты, олигосахариды и низкомолекулярные фрагменты, обладают проангиогенными свойствами [29]. Это способствует васкуляризации имплантата, однако важно, чтобы он сохранял свою структуру до тех пор, пока собственные регенерирующие ткани организма не заменят имплантат.

Выходом в данной ситуации может стать использование природных материалов, например углеводов, но не животного, а растительного происхождения. Являясь натуральными биополимерами, они, с одной стороны, максимально соответствуют свойствам естественного внеклеточного матрикса, обладают биосовместимостью, нетоксичны и иммунологически инертны. С другой стороны, скорость деградации этих материалов в организме млекопитающих намного ниже, чем биополимеров животного происхождения. Различные углеводы растительного происхождения – альгинаты, агароза, метилцеллюлоза – исследуются как перспективные материалы для конструирования искусственного внеклеточного матрикса.

Альгинаты – полисахариды, получаемые из бурых водорослей. Альгиновая кислота представляет собой линейный полимер, мономерами которого являются (1–4)-связанная β -D-маннуриновая кислота или α -L-гулуриновая кислота, ковалентно соединенные друг с другом в различной последовательности.

Полимеры альгиновой кислоты легко образуют высокогидрофильные, иммунологически инертные и биосовместимые гели при добавлении к ним ионов кальция. Культивирование обкладочных обонятельных клеток, шванновских клеток и стромальных клеток красного костного мозга на альгинатном геле трансформирует их в атипичные клетки сферической формы (метаболическая активность клеток при этом ингибируется) [31]. Но когда альгинатный гель, подвергнутый лиофильной сушке и представляющий собой губку, имплантировали в поврежденный спинной мозг крыс, он стимулировал рост аксонов [24]. Внедрение анизотропного капиллярного геля на основе альгинатов в поврежденный шейный отдел спинного мозга способствовало росту регенерирующих аксонов [33, 37].

Агароза – это полисахарид из красных водорослей. Агарозу, так же как и альгинаты, применяют для реконструктивной терапии спинальных травм в ходе экспериментов на лабораторных животных. Наибольшее

применение нашли лиофильно высушенные гидрогели агарозы, которые в виде губки вводили в область дефекта спинного мозга. Такой клеточный каркас сохранял свою микроструктуру даже без дополнительных поперечных шивков [40]. Гели, которые имеют поры, ориентированные параллельно продольной оси спинного мозга, создают каналы, по которым регенерирующие аксоны прорастают в имплантат, а внедрение нейротрофических субстанций, таких как нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor – BDNF), дополнительно стимулировало этот процесс [41]. Однако, несмотря на успешное прорастание аксонов в каналы агарозного матрикса, отростки нейронов не могли преодолеть границу между имплантатом и тканью реципиента [16].

Также разрабатываются гели, которые полимеризуются уже в месте дефекта, максимально заполняя область травмы и обеспечивая поддержку регенерации спинного мозга [23]. Имплантация геля, состоящего только из агарозы, тем не менее, характеризовалась достаточно выраженной астроцитарной реакцией на границе имплантата. Внедрение липидных трубок с нейротрофическим фактором мозга уменьшало размеры глиального рубца и стимулировало прорастание аксонов в матрикс.

Материалы, состоящие только из растительных углеводов, применяют для лечения моделируемых травм центральной нервной системы в виде лиофильно высушенных губок. Однако более перспективными являются все-таки материалы в форме гидрогелей, так как они имитируют естественное внеклеточное вещество. Гели на основе исключительно растительных углеводов не поддерживают рост аксонов. Поэтому продолжается исследование белковых матриксных материалов. Белки внеклеточного матрикса животных обладают хорошими адгезионными свойствами, позволяют клеткам мигрировать и поддерживают рост аксонов.

Коллагены – самые обильные белки во внеклеточном матриксе животных – активно изучаются в качестве перспективных матриксных материалов для создания имплантатов, в том числе и для лечения травм центральной нервной системы.

Коллаген I типа – самый первый из биополимеров, который начали использовать для культивирования клеток *in vitro* и в качестве основы для тканевых и клеточных имплантатов. Показана его эффективная способность поддерживать культуры нейтральных клеток в двумерных и трехмерных системах. Применение коллагена в качестве консолидирующего субстрата в модели травмы спинного мозга приводило к восстановлению функционирования нервной системы [28].

Комплексный гидрогель, состоящий из двух типов коллагена – коллагена птиц и коллагена млекопитающих, запатентован под торговой маркой «Сферогель-Э» и успешно проходит испытания [8]. Под руководством П.А. Мотавкина в сотрудничестве с разработчиками материала проводятся доклинические исследования, и уже получены оригинальные экспериментальные

данные по применению «Сферогеля-Э», имплантированного вместе с инкорпорированными обкладочными нейроэпителиальными клетками на модели острой спинальной травмы у крыс [1].

Матриксные материалы на основе коллагена I типа для регенерации спинного мозга применяют в самых различных формах. Например, в одном эксперименте в область травмы спинного мозга крыс внедряли трубку из этого коллагена [39]. В другом варианте эксперимента проксимальный и дистальный участки соединили, обмотав их мембраной из коллагенов I и III типов (BioGide membrane). Дополнительно животным помимо двух указанных видов имплантатов ввели ту же коллагеновую мембрану, примыкающую к дорзальному участку спинного мозга. Результаты экспериментов показали, что мембрана на поверхности проксимального участка спинного мозга эффективно ингибировала формирование глиального рубца. Самой перспективной оказалась группа, в которой дорзальный барьер сочетался с мембраной, окружающей спинной мозг в месте травмы. Этот вариант имплантата демонстрировал самые высокие показатели прорастания аксонов. Результаты других исследований показали, что имплантация трубки из хитозана, заполненной коллагеном I типа, в область неполного дефекта спинного мозга приводила к восстановлению проводимости в спинном мозге [25]. На модели травмы спинного мозга кролика коллаген I типа использовали также в виде волокон [52].

Коллаген IV типа является компонентом глиального рубца, поэтому ему в процессе регенерации центральной нервной системы первоначально отводилась исключительно ингибиторная роль [26]. В то же время исследования, проведенные на культурах нейтральных клеток, показали, что коллаген IV типа действует по-разному в зависимости от концентрации белка [13]. Гели на основе агарозы, модифицированной ковалентно связанным коллагеном IV типа, стимулировали рост аксонов при концентрации коллагена до 300 мкг/мл, более высокие концентрации угнетали рост аксонов. Так как коллаген IV типа участвует в формировании нервной системы, в миграции клеток и аксонов [35], то очевидно, что использование его в качестве материала для нейротрансплантации может принести успех при условии подбора оптимальной концентрации.

Однако, несмотря на успехи в терапии травм центральной нервной системы, белковые материалы не лишены недостатков. Так же как и другие вещества животного происхождения, они быстро разрушаются в организме реципиента. Кроме того, матрикс, состоящий только из белков, не способен максимально имитировать естественное внеклеточное окружение – комплекс белков и углеводов. Для каждой ткани соотношение этих полимеров уникально, и оно должно учитываться при разработке искусственного матрикса в регенеративной медицине.

Матригель – комплексный внеклеточный матрикс, получаемый путем сольюблизации базальных

мембран, синтезируемых клетками мышины саркомы EHS (Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma). В его состав входят ламинин, коллаген IV, гепаран-сульфат протеогликан, энтактин/нидоген. Матрикс содержит трансформирующий фактор роста- β , эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста, фактор роста фибробластов и др. Матригель использовали для имплантации в поврежденный спинной мозг крыс совместно с шванновскими клетками, что приводило к прорастанию имплантата аксонами, кровеносными сосудами, инфильтрацией макрофагами и фибробластами [34]. Имплантация нейроэпителиальных клеток, заключенных в матригель, в поврежденный спинной мозг крыс также приводила к регенерации и частичному восстановлению функций [51]. Возможность использования матригеля в качестве основы для биополимерно-клеточных имплантатов рассматривается и сейчас. Но эти исследования вряд ли найдут практическое применение в репаративной медицине, так как, являясь продуктом опухоли, матригель не позволяет осуществлять контроль пролиферации имплантируемых клеток и, напротив, может стимулировать их размножение и злокачественную трансформацию.

Ведутся разработки по созданию композитных гелей, в которых в качестве углеводной составляющей используют гиалуроновую кислоту. Например, коллаген-гиалуроновый гель использовали как трехмерный матрикс для культивирования шванновских клеток. Клетки сохраняли жизнеспособность, секретировали нейротрофические факторы. Добавление ламинина усиливало их секреторный потенциал [43].

Были созданы и изучены двухкомпонентные матриксы, основанные на коллагене, как перспективные материалы для реконструктивной терапии [17]. Один из этих матриксов содержал в качестве дополняющего коллаген компонента гиалуроновую, второй – альгиновую кислоту. Фибробласты голосовых связок свиньи внедряли в эти гели и культивировали в течение 4 недель. Установили, что матрикс, содержащий коллаген-альгинат, является более подходящим для трансплантации, так как этот гель менее подвержен сжатию со временем и медленнее деградирует в организме.

Гели на основе альгинатов очень слабо поддерживают адгезию клеток нейробластомы [14]. Культивирование на поверхности альгинатных гелей, модифицированных ламининспецифичным пептидом YIGSR, увеличивало адгезию клеток в 40 раз, стимулируя при этом рост аксонов. Покрытие альгинатного геля ламинином также увеличивало адгезию клеток, но не стимулировало рост аксонов.

Композитные гели обладают рядом преимуществ. Они имитируют естественный неклеточный матрикс животных не только по химическому составу. Оптимальное соотношение белков и углеводов позволяет обеспечить необходимые реологические свойства материала. Внедрение агарозы увеличивает эластические свойства коллагеновых гелей [45]. Агарозный гель формирует сеть внутри сети волокон коллагена, не нарушая

их структуры, однако влияет на миграцию клеток внутри таких гелей. Агароза замедляет инвазию глиальных элементов внутрь гелей. Меняет также характер движения клеток – с мезенхимального на амебоидное.

Включение углеводного компонента также влияет на размер пор гидрогеля. В.М. Gillette et al. [15] создали гидрогель, который состоит из двух компонентов, причем один из них формирует стабильную сеть полимера, а степень полимеризации второго регулируется. Микроструктура коллагеновых фибрилл в двухкомпонентном геле отличается от таковой в чистом коллагеновом геле. Размер ячеек коллагеновой сетки в однокомпонентном геле равен 16 мкм, в то время как в геле, состоящем из коллагена и альгината, примерно 30 мкм, что не зависит от состояния альгинатного геля, регулируемого концентрацией ионов кальция. Установлено, что сами волокна коллагена в присутствии альгината формируются более длинными и толстыми. Полученные ранее данные о размере волокон коллагена при полимеризации с гепарином подтверждают, что в присутствии гликополимеров сеть коллагена становится более рыхлой, а диаметр волокон увеличивается [9].

Еще одно преимущество композитных гелей заключается в том, что присутствие углеводных полимеров замедляет деградацию белковых молекул. В искусственно синтезированном матриксе волокна коллагена II типа, покрытые гиалуроновой кислотой (пришитой при помощи диметиламинопропил карбодиимида), более устойчивы к коллагеназе, а клетки, культивируемые в таком матриксе, лучше пролиферируют, чем в коллагеновом геле [10]. В естественных условиях гиалуроновая кислота ингибирует интерлейкин-1-опосредованную активацию металлопротеиназ, разрушающих коллаген [42].

Следующим этапом в разработках искусственного внеклеточного матрикса является создание трехкомпонентных гелей. Китайские ученые разработали биополимерный матрикс, состоящий из коллагена, гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата в соотношении 9:1:1 [46]. Такой матрикс со средним диаметром пор 109 мкм был более устойчивым к деградации и обладал лучшими эластическими свойствами, чем гели только из коллагена-хондроитинсульфата или коллагена и гиалуроновой кислоты. Материал исследовали как средство для лечения ожоговых ран. Матрикс стимулировал прикрепление клеток и их пролиферацию, и в целом – более быстрое заживление ран, чем в контроле.

Был разработан и изучен похожий по составу гель, состоящий из коллагена, гиалуроновой кислоты и хитозана [27]. Как показали тесты на биосовместимость, термостабильность, биостабильность оптимальное соотношение компонентов (коллаген, гиалуроновая кислота, хитозан) также составляет 9:1:1.

Композитный гелевый матрикс, состоящий из гиалуроновой кислоты и ламинина, а также снабженный комплексом ростовых факторов, имплантировали в область дефекта спинного мозга крыс, что способствовало восстановлению проводящих функций [38].

Результаты многочисленных исследований в области использования искусственных и природных полимеров для терапии травм центральной нервной системы показывают, что ни один из полимеров сам по себе не обладает всеми свойствами, необходимыми для успешного восстановления ее целостности и функционирования. Только композитные материалы способны имитировать структуры и функции естественного внеклеточного матрикса, индуцировать нейрогенез, восстановление проводниковых функций нервной системы, а также способны подвергаться контролируемой биодеградации с последующим замещением собственными тканевыми структурами организма. Только такие материалы будут в дальнейшем перспективны для разработки биоинженерных аналогов нервной ткани.

Следующим шагом в создании биополимерных материалов для терапии травм центральной нервной системы является структурирование матрикса. Компоненты матрикса должны создавать паттерн, направляющий рост регенерирующих аксонов. На сегодняшний день существует два основных способа микроструктурирования искусственного внеклеточного матрикса: литография и метод инжекторного напыления (струйной печати) [21, 36]. Методом многоканального инжекторного напыления нейроиндукторный белок, меченый флюоресцеином изотиоцианатом, наносили в виде треков на поддерживающий слой матрицы (рис., а)*. Нейральные стволовые клетки эмбрионального мозга крысы в культуре формировали нейросферы (рис., б)*. При их пересеве на микроструктурированные матрицы, они ориентировались вдоль нанесенных треков матриксного биополимера и дифференцировались в нейроны и глиальные элементы (рис., в)*.

Таким образом, на современном этапе наиболее перспективным направлением в разработке методов лечения травм нервной системы является создание микроструктурированных композитных матриксных имплантатов, обладающих трехмерным паттерном сигнальных молекул, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток, стимулирующих адгезию и миграцию клеток, рост аксонов и восстановление проводниковых функций мозга.

References

1. Brjuhoveckij I.S., Djuzjen I.V., Motavkin P.A. Morpho chemical characteristics of rats spinal cord after thoracic segmentectomy and transplantation polymeric collagen neuromatrix "Sferogel-E" with incorporated parietal neuroepithelial cells, *Kletochnaja transplantol. i tkanevaja inzhenerija*. 2008. Vol. 3, No. 2. P. 57–62.
2. Motavkin P.A. About changes in the lumbar and sacral spinal nodes with sciatic nerve injury, *Arh. patol.* 1959. No. 1. P. 34–44.
3. Motavkin P.A., Baranov V.F. The luminescent-microscopic assessment of RNA protoneuronov under retrograde reactions, *Arh. anatomii, gistologii i jembriologii*, 1971. V. LXI, No. 7. P. 70–73.
4. Motavkin P.A., Pigolkin Ju.I., Kaminskij Ju.V. The histophysiology circulation in the spinal cord. M.: Nauka, 1994. 233 p.
5. Motavkin P.A., Sidorova A.G., Baranov V.F. Wollers degeneration and reduction reactions of neurons extension cord // *Dep. VINITI* 04.11.1992. No. 3172-V92. 107 p.

* На цветной вкладке, с. 72.

6. Motavkin P.A., Chertok V.M. The histophysiology vascular mechanisms of cerebral circulation. M.: Medicina, 1980. 200 p.
7. Pigolkin Ju.I., Volodin S.A., Sherstjuk B.V. et al. The morphofunctional characteristics of the spinal cord microvasculature under its experimental injury, *Vopr. neirohirurgii*. 1989. No. 4. P. 30–31.
8. Jarygin V.I., Banin V.V., Jarygin K.I., Brjuhoveckij A.S. The regeneration of the rats spinal cord after thoracic segmentectomy: growth and repair of nerve conductors, *Morfologija*. 2006. V. 129, No. 1. P. 30–38.
9. Brightman A.O., Rajwa B.P., Sturgis J.E. et al. Time-lapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and extracellular matrix assembly in vitro // *Biopolymers*. 2000. Vol. 54, No. 3. P. 222–234.
10. Chen Y.G., Lee, M.W., Tu Y.H. et al. Surface coupling of long-chain hyaluronan to the fibrils of reconstituted type II collagen, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2010. Vol. 37. P. 222–226.
11. Cui F.Z., Tian W.M., Fan Y.W. et al. Cerebrum repair with PHPMA hydrogel immobilized with neurite-promoting peptides in traumatic brain injury of adult rat model, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2003. Vol. 18, No. 6. P. 413–432.
12. Cui F.Z., Tian W.M., Hou S.P. et al. Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2006. Vol. 17, No. 12. P. 1393–1401.
13. Cullen D.K., Lessing M.C., LaPlaca M.C. Collagen-dependent neurite outgrowth and response to dynamic deformation in three-dimensional neuronal cultures, *Annals of Biomedical Engineering*. 2007. Vol. 35, No. 5. P. 835–846.
14. Dhoot N.O., Tobias C.A., Fischer I., Wheatley M.A. Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004. Vol. 71A, No. 2. P. 191–200.
15. Gillette B.M., Jensen J.A., Wang M.X. et al. Dynamic hydrogels: switching of 3D microenvironments using two-component naturally derived extracellular matrices, *Advanced Materials*, 2010. Vol. 22, No. 6. P. 686–691.
16. Gros T., Sakamoto J.S., Blesch A. et al. Regeneration of long-tract axons through sites of spinal cord injury using templated agarose scaffolds, *Biomaterials*, 2010. Vol. 31, No. 26. P. 6719–6729.
17. Hahn M.S., Teply B.A., Stevens M.M. et al. Collagen composite hydrogels for vocal fold lamina propria restoration, *Biomaterials*, 2006. Vol. 27, No. 7. P. 1104–1109.
18. Hejcl A., Lesny P., Pradny M. et al. Biocompatible Hydrogels in Spinal Cord Injury Repair, *Physiological research*. 2008. Vol. 57. P. S121–S132.
19. Horn E.M., Beaumont M., Shu X.Z., et al. Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury, *Journal of Neurosurgery-Spine*. 2007. Vol. 6, No. 2. P. 133–140.
20. Hou S., Tian W., Xu Q. et al. The enhancement of cell adherence and inducement of neurite outgrowth of dorsal root ganglia co-cultured with hyaluronic acid hydrogels modified with Nogo-66 receptor antagonist in vitro, *Neuroscience*. 2006. Vol. 137, No. 2. P. 519–529.
21. Hsu S.H., Su C.H., Chiu I.M. A novel approach to align adult neural stem cells on micropatterned conduits for peripheral nerve regeneration: a feasibility study, *Artif. Organs*. 2009. Vol. 33, No. 1. P. 26–35.
22. Hunt D., Coffin R.S., Anderson P.N. The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review, *Journal of Neurocytology*. 2002. Vol. 31, No. 2. P. 93–120.
23. Jain A., Kim Y.T., McKeon R.J., Bellamkonda R.V. In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury, *Biomaterials*. 2006. Vol. 27, No. 3. P. 497–504.
24. Kataoka K., Suzuki Y., Kitada M. et al. Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats, *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001. Vol. 54, No. 3. P. 373–384.
25. Li X., Yang Z., Zhang A. et al. Repair of thoracic spinal cord injury by chitosan tube implantation in adult rats, *Biomaterials*. 2009. Vol. 30. P. 1121–1132.
26. Liesi P., Kaupilla T. Induction of type IV collagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar, *Experimental Neurology*. 2002. Vol. 173, No. 1. P. 31–45.
27. Lin Y.C., Tan F.J., Marra K.G. et al. Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications, *Acta Biomaterialia*. 2009. Vol. 5. P. 2591–2600.
28. Ma W., Fitzgerald W., Liu Q.Y. et al. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels, *Experimental Neurology*. 2004. Vol. 190, No. 2. P. 276–288.
29. Mio K., Stern R. Inhibitors of the hyaluronidases, *Matrix Biology*. 2002. Vol. 21, No. 1. P. 31–37.
30. Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarni Medicina*. 2008. Vol. 53, No. 8. P. 397–411.
31. Novikova L.N., Mosahebi A., Wiberg M. et al. Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation, *Journal of Biomedical Materials, Research Part A*. 2006. Vol. 77A, No. 2. P. 242–252.
32. Park J., Lim E., Back S. et al. Nerve regeneration following spinal cord injury using matrix metalloproteinase-sensitive, hyaluronic acid-based biomimetic hydrogel scaffold containing brain-derived neurotrophic factor, *Journal of Biomedical Materials, Research Part A*. 2010. Vol. 93A, No. 3. P. 1091–1099.
33. Park T.G., Lu W.Q., Crofts G. Importance of in vitro experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation in protein encapsulated poly (D,L-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres, *Journal of Controlled Release*. 1995. Vol. 33, No. 2. P. 211–222.
34. Pinzo A., Calancie B., Oudega M., Noga B.R. Conduction of impulses by axons regenerated in a Schwann cell graft in the transected adult rat thoracic spinal cord, *Journal of Neuroscience Research*. 2001. Vol. 64. P. 533–541.
35. Perris R., Syfrig J., Paulsson M., Bronnerfraser M. Molecular mechanisms of neural crest cell attachment and migration on types I and IV collagen, *J. Cell Science*. 1993. Vol. 106. P. 1357–1368.
36. Phillippi J.A., Miller E., Weiss L. et al. Microenvironments engineered by inkjet bioprinting spatially direct adult stem cells toward muscle- and bone-like subpopulations, *Stem Cells*. 2008. Vol. 26. P. 127–134.
37. Prang P., Muller R., Eljaouhari A. et al. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels, *Biomaterials*. 2006. Vol. 27, No. 19. P. 3560–3569.
38. Rochkind S., Shahar A., Fliss D. Development of a tissue-engineered composite implant for treating traumatic paraplegia in rats, *European Spine Journal*. 2006. Vol. 15. P. 234–245.
39. Sajjad S.M. Spinal cord regeneration via collagen entubulation: master's thesis. Massachusetts institute of technology, 2004. 57 p.
40. Stokols S., Tuszynski M.H. The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury, *Biomaterials*, 2004. Vol. 25, No. 27. P. 5839–5846.
41. Stokols S., Tuszynski M.H. Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury, *Biomaterials*. 2006. Vol. 27, No. 3. P. 443–451.
42. Surazynski A., Milyk W., Czarnomysy R. et al. Hyaluronic acid abrogates nitric oxide-dependent stimulation of collagen degradation in cultured human chondrocytes, *Pharmacological Research*. 2009. Vol. 60, No. 1. P. 46–49.
43. Suri S., Schmidt C.E. Cell-Laden Hydrogel Constructs of

- Hyaluronic Acid, Collagen, and Laminin for Neural Tissue Engineering, *Tissue Engineering, Part A*. 2010. Vol. 16, No. 5. P. 1703–1716.
44. Teng Y.D., Lavik E.B., Qu X.L. et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. Vol. 99, No. 14. P. 3024–3029.
45. Ulrich T.A., Jain A., Tanner K. et al. Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen–agarose matrices, *Biomaterials*. 2010. Vol. 31. P. 1875–1884.
46. Wang W.H., Zhang M., Lu W. et al. Cross-linked Collagen-Chondroitin Sulfate-Hyaluronic Acid Imitating Extracellular Matrix as Scaffold for Dermal Tissue Engineering, *Tissue Eng. Part C-Methods*. 2010. Vol. 16. P. 269–279.
47. Wei Y.T., He Y., Xu C.L. et al. Hyaluronic acid hydrogel modified with nogo-66 receptor antibody and poly-(L)-lysine to promote axon regrowth after spinal cord injury, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B-Applied Biomaterials*. 2010. Vol. 95B, No. 1. P. 110–117.
48. Woerly S., Doan V., Evans-Martin F. et al. Spinal cord reconstruction using NeuroGel (TM) implants and functional recovery after chronic injury, *Journal of Neuroscience Research*. 2001. Vol. 66, No. 6. P.1187–1197.
49. Woerly S., Pinet E., de Robertis L. et al. Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel), *Biomaterials*. 2001. Vol. 22, No. 10. P. 1095–1111.
50. Woerly S., Doan V.D., Sosa N. et al. Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord, *Journal of Neuroscience Research*. 2004. Vol. 75, No. 2. P. 262–272.
51. Xiao M., Klueber K.M., Lu C. et al. Human adult olfactory neural progenitors rescue axotomized rodent rubrospinal neurons and promote functional recovery, *Exp. Neurol*. 2005. Vol. 194. P. 12–30.
52. Yoshil S., Ito S., Shima M. et al. Functional restoration of rabbit spinal cord using collagen-filament scaffold, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009. Vol. 3, No. 1. P. 19–25.

Поступила в редакцию 10.05.2011.

BIOCOMPATIBLE MATRIX IMPLANTS FROM NATURAL AND SYNTHETIC POLYMERS AS PROMISING PRODUCTS INTENDED FOR TREATMENT OF DEGENERATIVE AND POST-INJURY DISEASES OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Yu.S. Khotimchenko^{1,2}, A.V. Scheblykina¹, V.V. Kumeiko^{1,2}

¹A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russia), ²Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The authors provide an overview of modern studies and developments in the field of biocompatible implantable materials designed for treating degenerative and post-injury pathologies of central nervous system. As reported, the critical analysis of materials and their components derived from natural and synthetic polymers allows concluding that their application as matrix implants can make it possible to recover the integrity of injured brain, adjust supportive and trophic functions, and induce reparative processes due to inner and implantable cell sources. The up-to-date state of biomedical material sciences and tissue engineering for the needs of neurotransplantation is characterised as analysis of capability of materials to imitate the structure and functions of natural extracellular matrix, inducing neurogenesis and recovering conductive functions of the nervous system, and capabilities of materials to be exposed to controlled biodegradation with subsequent substitution with tissue structures.

Key words: biocompatible polymers, matrix implants, brain injuries, neurodegenerative diseases.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 2, p. 54–60.

УДК 611.018.82:576.3

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ НЕЙРОНАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МОЗГЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В.Е. Охотин¹, А.В. Ревещин², Г.В. Павлова¹

¹Институт биологии гена РАН (119334 г. Москва, ул. Вавилова, 34/5),

²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (119071 г. Москва, Ленинский пр-т, 33)

Ключевые слова: стволовые клетки, нейроны, мозг, дифференцировка и трансплантация.

В последние 15 лет получены новые знания о стволовых клетках, позволяющие по-новому понять функционирование нервной ткани в норме и патологии. Показано, что пролиферирующие стволовые клетки в дефинитивном мозге при определенных условиях могут участвовать в репаративной регенерации, замещая погибшие элементы. Установлены геномные механизмы управления пролиферацией и дифференцировкой стволовых клеток. Показано их участие в генезе злокачественных опухолей и тропизм этих клеток к опухолям. Данные факты открывают новые направления в исследовании функционирования и развития мозга. Нейтральные стволовые клетки могут быть использованы для создания новых технологий, лечения нейродегенеративных и онкологических заболеваний мозга.

Стволовые клетки принято разделять на эмбриональные, выделяемые из бластоцисты, и региональные, получаемые из эмбрионов более поздних стадий развития или из органов взрослых особей. Эмбриональные

стволовые клетки мультипотентны, т.е. дают начало производным всех зародышевых листков, включая и клетки нервной системы. Развиваясь, они проходят ряд этапов, формирующих пулы региональных стволовых клеток с разными потенциальными возможностями. Стволовые клетки взрослого организма в определенной степени ограничены в своих возможностях и дают начало производным преимущественно одного зародышевого листка. Они составляют тканевый восстановительный резерв и способствуют замещению дефектов в разных органах, включая и нервную систему [27].

В настоящее время считается, что стволовая клетка должна удовлетворять трем основным условиям: 1) тотипотентность или мультипотентность, т.е. способность генерировать различные типы клеток, 2) высокий пролиферативный потенциал, 3) самовоспроизводимость (т.е. способность воспроизводить идентичных себе потомков в результате симметричных делений) [41].

Ревещин А.В. – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории сравнительной нейробиологии позвоночных ИПЭЭ РАН; e-mail: revishchin@mail.ru