

Шопова Злата Степанівна

студентка III курсу

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Україна

Ільчевський Володимир Володимирович

студент IV курсу

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Україна

Литвинов Григорій Сергійович

професор кафедри промислової біотехнології та біофармації

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Україна

ПРОБЛЕМИ РОЗВИТКУ СУЧАСНОЇ БІОТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

***Анотація.** Біотехнологія XXI століття ставить перед собою покращення якості людського життя, в тому числі за допомогою біотканинної інженерії. Вирощування тканин та органів – перспективний шлях у подоланні недоліків трансплантології, клінічних випробувань та експериментів, масового знищення популяцій тварин задля задоволення людських потреб. Проте науковці постійно стикаються з проблемами різного масштабу та напрямку, подолання яких спричинює оптимізацію та розвиток біотканинної інженерії як самостійного напрямку регенеративної медицини та перехідного етапу до органної інженерії.*

***Ключові слова:** тканинна інженерія, стовбурові клітини, позаклітинний матрикс, фактори росту, клітинні каркаси.*

Травмування є невід’ємною частиною людського життя, вберегтися від якої, на жаль, неможливо. Але питання не в тому, як уникати пошкоджень, а в тому, як покращити одужання та регенерацію організму. Метою тканинної інженерії є створення надскладних біологічних структур *in vitro*, які функціонально наближаються до динаміки живих тканин. Стратегії біотехнології тканин полягають у вирішенні питань нестачі донорних органів

та інших перешкод, викликаних відторгненням імплантованих структур; випробування новосинтезованих ліків, що призведе до гуманізації лабораторних експериментів; моделювання уражених певними хворобами тканин для винайдення оптимального способу лікування з дотриманням усіх фізіологічних та біохімічних умов середовища.

Тканинна інженерія – міждисциплінарна галузь новітньої біотехнології, яка стоїть на перетині інженерних, таких як мікро- та нанотехнології, машинобудування, адитивного виробництва, системної інтеграції, та природніх: молекулярної біології, клітинної та генної інженерії, фізіології, ендокринології, тощо – наук для відновлення чи заміни пошкоджених (або відсутніх) тканинних структур. До двох провідних способів застосування тканинної біотехнології належать імплантація штучно створених суспензій клітин до організму для регенерації пошкоджених структур та створення конструкцій *ex vivo* для їх трансплантації разом з каркасами для повної або часткової заміни органів.

Як вже було зазначено, однією з першопричин становлення тканинної інженерії є гостра проблема нестачі донорних органів для трансплантацій. Так, кількість чоловіків, жінок та дітей у національному списку черги на трансплантацію станом на лютий 2021 року складає більше ніж 107 000 людей. В середньому, щодня 17 осіб гинуть в очікуванні донора, в той час коли лише 3 з 1000 людей вмирають таким чином, що дозволяє донорство [1]. Тому питання у забезпеченні матеріалом необхідних операцій, які здатні врятувати людське життя, залишається відкритим.

Досягнення біотехнології тканин поки не досягнули масштабу синтезу цілих складних органів, таких як: серце, легені, нирки, тощо, але стрімкий розвиток даної галузі дає надію на те, що проблеми, які існують сьогодні, вже через кілька десятиліть залишаться на сторінках історії.

Та на щастя, успіхи тканинної інженерії вже скоро зможуть полегшити життя людей. Вже сьогодні на запит «tissue engineering» пошукова система Google демонструє 434 000 000 результатів та біля 180 000 000 посилань у

різних публікаціях. Дані цифри ростуть щодня, що свідчить про велику зацікавленість вчених у цьому напрямку біотехнології, можливе зростання фінансування експериментів та збільшення практик використання тканинної інженерії. Основними проблемами на шляху реалізації тканинної інженерії постають оптимізація та доступність біоматеріалів і джерел донорних клітин, які мають бути специфічними для певних тканин та органів, васкуляризація та іннервація, капіляризація, відтворення точних копій природного середовища розвитку неотканин, а також питання довгостроковості існування тканинних конструкцій.

Трьома китами, на яких стоїть культивування тканин *in vitro* є базові клітини, каркас та фактори росту. Тканинні конструкції отримують шляхом нарощування стовбурових клітин на децеллюризовані каркаси, які забезпечують необхідне середовище для нарощування нової тканини. Фактори росту сприяють встановленню напрямку диференціювання стовбурових клітин.

Клітинний компонент конструкцій може бути представлений як стовбуровими, так і диференційованими клітинами. З точки зору практичного використання, більшу увагу заслуговують саме стовбурові клітини, які дають початок усім тканинам живого організму. За потреби вони диференціюються та виконують функцію росту тканини чи її регенерацію або продукують дочірні клітини. Перешкодою цього потенціалу є неповна визначеність умов для самореплікаційної експансії стовбурових клітин. Розглядають тотипотентні, плюрипотентні, уніпотентні та мультипотентні клітини [4].

Тотипотентні або ембріональні стовбурові клітини – це клітини, які утворюються внаслідок злиття статевих клітин і перших послідовних поділів зиготи, здатні генерувати всі типи клітин організму.

Плюрипотентні клітин утворюються внаслідок поділу тотипотентних клітин і також можуть диференціюватись у всіх типи клітин, але від попереднього типу їх відрізняє неможливість повністю створити новий організм.

Мультипотентні та уніпотентні клітини здатні утворювати сукупність близьких типів клітин або лише один тип відповідно. Вони також володіють

здатністю до самовідтворення.

Стовбурові клітини не лише дають початок диференційованим клітинам, а й сприяють процесу загоєння, оскільки містять майже в усіх тканинах живих організмів. Але вектор диференціації задає саме навколишнє середовище, яке визначається компонентним складом та позаклітинним матриксом.

Донорні клітини імплантують у так звані каркаси – трьохмірні пористі матрикси, які здатні забезпечувати умови життєдіяльності клітинних компонентів у процесі формування тканин, їх проліферацію та диференціювання. З плином часу штучні каркаси поступово заміщуються на фрагменти позаклітинного матриксу, синтезовані клітинами. Звідси впливає умова біовідповідності, біосумісності та біодеградованості штучних та природних матриксів.

Для вдалого досліду зі створення біоштучної тканини, каркас повинен відповідати наступним вимогам [2]:

– пористість: для щільного заселення клітин у каркаси останні мають володіти чим більшою площею, яку можна отримати шляхом додавання великої кількості мікропор;

– біодеградованість: для того, щоб отримана ділянка тканини мала змогу самовідтворюватись, каркас має володіти здатністю до розкладання, тим самим даючи можливість новосинтезованим клітинам білкам створити власне середовище для опору.

– наближеність до оригінальної форми: оскільки отримана тканина має повторювати фізіологію природньої, то варто наголосити, що просто відповідність клітинному складу не дає потрібного результату. Тому необхідно слідкувати за формою каркасу для створення максимально оригінальної тканини.

Штучні каркаси можуть бути отримані завдяки 3D-принтингу або ж взяті з донорної тканини. Щоб використовувати їх у процесі культивування, необхідно очистити вже наявні клітини, тобто провести децеллюризацію (хімічними, фізичними або комбінованими методами).

Позаклітинний матрикс – це поєднання волокнистих структур з

розчиненими субстанціями, які можуть містити необхідні фактори росту, коферменти, електроліти тощо. Основну частку розчину складають глікопротеїни та протеоглікани. Волокна складаються переважно з колагену та можуть містити еластин чи фібрин.

Створення організмом повноцінної тканини – надзвичайно складний процес, який потребує абсолютного виконання всіх умов диференціації клітин, починаючи від температури та тиску, закінчуючи іонною силою розчину. У сукупності з біологічними факторами, ці фізичні параметри дозволяють стовбуровим клітинам перетворитися на потрібний тип клітин та в подальшому створити цілий організм.

Існують два методи культивування структури клітини-каркас: *in vivo* та *in vitro*. Перший – це переміщення конструкції у живий організм для регенерації тканини, другий – перемістити до біореактору.

Фактори росту, за своєю природою, це набір протеїнів, які грають ключову роль у полімерації та диференціації клітин. Утворюються вони внаслідок ендогенної секреції аутокринними чи паракринним клітинами [3]. При пересадці такої тканини (яка містить соматичні та стовбурові клітини) швидкість регенерації пошкодженої тканини значно вища, оскільки фактори росту сприяють кінетиці цього процесу.

Транспорт факторів росту до місця застосування заслуговує на найбільшу увагу. Їхня одноразова ін'єкція не є ефективною, оскільки білки здатні до міграції у розчині, а тому швидко змінюють своє положення, знаходячись у броунівському русі. На щастя, було винайдено декілька методів транспорту факторів росту до принципово конкретного місця. Один з них завдячує технології CRISPR-Cas9, яка дозволила включити ген, який кодує даний фактор росту, у плазмід. Таким чином, при введенні даної плазмід у клітину, сама клітина буде створювати собі необхідні речовини для розвитку.

Як і будь-яка перспективна галузь сучасності, біотехнології, окрім їх незрівнянної користі, представляють ряд проблемних питань, над вирішенням яких працюють науковці, юристи та економісти. Основні перешкоди у ринку тканинної інженерії поділяються на фізіологічні та економіко-правові [5]:

– перш за все необхідно побудувати план посіву клітин, обрахувати необхідну пористість каркасу, спланувати кількість та якість внесених факторів росту тощо. Це основний етап у розробці тканин, який містить в собі забагато параметрів, слідкувати за якими дуже клопітно.

– одна з ключових проблем полягає у можливості зберігання та транспортування тканин, для яких повинні підтримуватись умови постійної перфузії та неоваскуляризації. В той час як для звичайних децеллюризованих каркасів такої проблеми немає, оскільки їх ринок більше нагадує ринок звичайних біоінженерних препаратів.

– біосумісність новосинтезованих тканин також може спричиняти певні труднощі, оскільки генетичний матеріал стовбурових клітин – основа здорової імплантації. Ризик відторгнення значно зменшується, якщо тканина була побудована з власних клітин пацієнта.

– проблеми соціально-політичного плану також не є виключенням. Влада багатьох країн ще не знаходиться на етапі прийняття маніпуляцій з людськими матеріалами, а особливо ембріональними [6]. Така ситуація значно сповільнює розвиток органної інженерії. Протести науковців при цьому цілком зрозумілі, втім людині, яка не розуміє багатьох елементарних речей людської біології, апелює сутностями речей. При згадці слова «ембріон» першою асоціацією є людина, а отже використовувати їх у дослідках, означає експерименти над людиною. Тому отриманий шматочок тканини буде мати не сутність живої матерії, а продукт катувань, що призупинить ринок торгівлі продуктами біотехнології тканин, оскільки попит буде знижуватись.

Основна перешкода органної інженерії полягає у складності насичення пулу стовбурових клітин необхідними комбінаціями факторів росту, які визначають індивідуальність органу, а також забезпечення сталості перфузії для підтримки життєвих параметрів протягом існування: кислотності, насиченості киснем, температури, тиску тощо. Отже, якщо навіть вдасться надрукувати судини (або ж створити їх за допомогою електроспінінгу), відкритим залишається питання створення середовища ідентичного природньому для благополучного росту та розвитку органів *in vitro*.

Важливу увагу також слід приділяти будові органів. Як відомо, органи зазвичай складаються з тканин декількох типів, причому важливим також є дотримання природної візуалізації, оскільки незліченні роки еволюції розробили ідеальний макет структур для функціонування. Будь-яка зміна у зовнішній або внутрішній структурі органу може призвести до втрати його фізіологічних функцій.

Однак у створенні поодиноких органів, замість їх систем, потрібно виокремлювати переваги та недоліки. На прикладі випробування ліків стає очевидним факт того, що дослід з використанням певного препарату на окремому органі може допомогти у визначенні фізіологічної дії цього препарату, але в той же час можна зробити помилкові висновки, оскільки у повноцінному живому органі даній речовині з певними лікарськими властивостями спочатку треба буде пройти цілий ряд ферментативних та метаболістичних перетворень, в тому числі і фільтрацію, що може перетворити корисний вплив препарату на смертельно токсичний.

Вирішення основних проблем матеріального забезпечення, теоретичної та практичної підготовки експериментів та створення моделей органів вже наближається, про що свідчить збільшення публікацій на дану тему. Ситуація з нормативно-правовим регулюванням у більш складному становищі. Перед науковцями стоїть важлива задача перш за все у зміні людського сприйняття стовбурових клітин як витратного матеріалу, за допомогою якого можна вирішити низку питань регенеративної медицини, а маніпуляції з тканинами природного походження – це не гра в Бога, а звичайна наука. Втім, досягнення цієї мети може затягнутись на десятки років.

Список джерел:

1. Organ Donation Statistics // <https://www.organdonor.gov/> URL: <https://www.organdonor.gov/learn/organ-donation-statistics> (дата звернення: 23.03.2021).
2. Eur Spine J. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // European Spine Journal. - 2008.
3. Ozlem Guzeloglu-Kayisli, Ph.D., Umit Ali Kayisli, Ph.D., and Hugh S. Taylor, M.D The Role of Growth Factors and Cytokines during Implantation: Endocrine and Paracrine Interactions

// Seminars in Reproductive Medicine. - 2009.

4. John D. Enderle, Joseph D. Bronzino INTRODUCTION TO BIOMEDICAL ENGINEERING. - THIRD EDITION изд. - Connecticut: Elsevier, 2012.
5. Yoshito Ikada Challenges in tissue engineering // Journal of the Royal Society Interface. - 2006.
6. Neil Stephens, Lucy Di Silvio, Iltud Dunsford, Marianne Ellis, Abigail Glencross, Alexandra Sextonf Bringing cultured meat to market: Technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture // Trends in Food Science & Technology. - 2018.