Экспериментальные подходы к регенерации и тканевой инженерии суставного хряща с использованием клеточно-инженерных конструкций Басок Юлия Борисовна

ОГЛАВЛЕНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

доктор наук Басок Юлия Борисовна

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОГО ХРЯЩА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Актуальность, мировая потребность и обзор основных существующих технологий тканевой инженерии для регенерации хрящевой ткани

1.2 Источники клеток для создания клеточно-инженерных конструкций хрящевой ткани

1.3 Миметики внеклеточного матрикса

1.3.1 Биополимерные гидрогели

1.3.2 Тканеспецифические матриксы из децеллюляризованных тканей

1.4 Методы получения миметиков внеклеточного матрикса для тканевой инженерии хряща

1.4.1 Способы получения гидрогелей из полимеров природного происхождения

1.4.2 Физические, химические и биологические методы децеллюляризации хрящевой ткани

1.5 Биореакторы для создания тканевых эквивалентов хрящевой ткани

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

2.2 Методы получения микродисперсного тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи

2.2.1 Метод криопомола для получения микрочастиц свиного хряща

2.2.2 Обработка растворами поверхностно-активных веществ

2.2.3 Инкубация в гипо- и гипертоничных растворах поверхностно-активных веществ

2.2.4 Лиофилизация

2.2.5 Замораживание и оттаивание

2.2.6 Обработка в среде сверхкритического СO2

2.2.7 Обработка ультразвуком

2.2.8 Обработка ДНКазой

2.3 Метод лазерной дифракции

2.4 Сканирующая электронная микроскопия

2.5 Гистологическое исследование

2.6 Иммуногистохимическое исследование

2.7 Флуоресцентное окрашивание двуцепочечной ДНК для оценки полноты децеллюляризации

2.8 Биохимические методы анализа

2.8.1 ДНК

2.8.2 Гликозаминогликаны

2.8.3 Фибриллярный коллаген (коллаген I, II, III, V типов)

2.9 Методы исследования биологической безопасности микродисперсного тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи

2.9.1 Цитотоксичность

2.9.2 Гемолиз, индуцированный поверхностью материала

2.9.3 Исследование местного действия in vivo

2.9.4 Исследование общетоксического действия

2.9.5 Генотоксичность

2.9.6 Репродуктивная/ эмбриональная токсичность

2.10 Оценка качества мезенхимальных стромальных клеток

2.11 Оценка действия мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека из различных источников на пролиферацию хондробластов человека

2.11.1 Культивирование хондробластов в кондиционированной среде

2.11.2 Непрямое сокультивирование хондробластов с мезенхимальными стромальными клетками

2.12 Сравнительное исследование матриксных и функциональных свойств инъекционных форм коллагенсодержащих клеточных носителей

2.12.1 Пролиферативная активность клеток при культивировании на инъекционных формах коллагенсодержащих клеточных носителей

2.12.2 Исследование жизнеспособности клеток методом флуоресцентной микроскопии

2.12.3 Формирование клеточно-инженерных конструкций хряща в статических условиях

2.12.4 Исследования функциональных свойств созданных клеточно-инженерных конструкций на экспериментальной модели остеоартроза in vivo

2.13 Формирование клеточно-инженерных конструкций хряща в динамических условиях

2.14 Статистические методы анализа результатов

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОДИСПЕРСНОГО ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО МАТРИКСА ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО СУСТАВНОГО ХРЯЩА СВИНЬИ

3.1 Микронизация суставного хряща свиньи

3.2 Разработка способа децеллюляризации микрочастиц суставного хряща свиньи с дополнительным включением этапов физических и биологических воздействий

3.2.1 Резкие изменения температуры с обработкой ДНКазой

3.2.2 Сверхкритический СО2 с обработкой ДНКазой

3.2.3 Ультразвук с обработкой ДНКазой

3.3 Определение оптимального способа децеллюляризации относительно сохранения состава

исходного внеклеточного матрикса

ГЛАВА 4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРОДИСПЕРСНОГО ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО МАТРИКСА ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО СУСТАВНОГО ХРЯЩА СВИНЬИ

4.1 Биологическая безопасность экспериментальных образцов in vitro и in vivo

4.1.1 Цитотоксичность in vitro

4.1.2 Гемосовместимость in vitro

4.1.3 Местное действие (имплантационный тест 6 месяцев)

4.1.4 Общетоксическое действие (имплантационный тест 2 месяца)

4.1.5 Генотоксичность

4.1.6 Репродуктивная/эмбриональная токсичность

4.2 Матриксные свойства экспериментальных образцов in vitro

4.2.1 Исследование адгезии мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани и хондробластов человека на микродисперсном тканеспецифическом матриксе

4.2.2 Культивирование хондробластов человека на микродисперсном тканеспецифическом матриксе

4.2.3 Культивирование мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека на

микродисперсном тканеспецифическом матриксе

ГЛАВА 5. ВЫБОР КЛЕТОЧНОЙ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

5.1 Сравнительный анализ хондрогенного потенциала мезенхимальных стромальных клеток человека, полученных из различных источников при культивировании в составе микросфер

5.2 Исследование влияния клеточного состава на формирование клеточно-инженерной конструкции хряща

5.3 Сравнительная характеристика стимулирующего действия мезенхимальных стромальных

клеток из различных источников на пролиферацию хондробластов человека

ГЛАВА 6. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ХРЯЩА НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ БИОМИМЕТИКОВ IN VITRO И IN VIVO

6.1 Композитный матрикс из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля и микрочастиц децеллюляризованного хряща

6.2 Пролиферативная активность мезенхимальных стромальных клеток человека при культивировании на гидрогелевом и тканеспецифическом матриксах

6.3 Хондрогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека при культивировании на гидрогелевоми тканеспецифическом матриксах

6.4 Исследование влияния инъекционного введения клеточно-инженерной конструкции, включающей мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека и коллагенсодержащие биомиметики внеклеточного матрикса, на регенерацию хряща в

экспериментальной модели адьювантного артрита in vivo

ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА МАЛОГАБАРИТНОГО ПЕРФУЗИОННОГО БИОРЕАКТОРА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕВОГО ЭКВИВАЛЕНТА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ НА ОСНОВЕ МИКРОДИСПЕРСНОГО ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО МАТРИКСА ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО СУСТАВНОГО ХРЯЩА СВИНЬИ

7.1 Выбор материала и размера пор подложки для культуральной камеры

7.2 Испытания перфузионного биореактора, заполненного модельным раствором

7.3 Создание тканевого эквивалента хряща в перфузионном биореакторе

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЫВОДЫ

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ПРИЛОЖЕНИЕ А Протокол испытаний местного действия тканеспецифических

мелкодисперсных матриксов (имплантационный тест)

ПРИЛОЖЕНИЕ Б Протокол испытаний общетоксического действия микродисперсного

тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи

ПРИЛОЖЕНИЕ В Протокол испытаний генотоксичности микродисперсного

тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи

ПРИЛОЖЕНИЕ Г Протокол испытаний репродуктивной токсичности микродисперсного тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи

ВВЕДЕНИЕ