

ОГЛЯДИ І РЕЦЕНЗІЇ

УДК 612.751.2:576.3

АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ ДЕФЕКТІВ СУГЛОБОВОГО ХРЯЦЦА: ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ НАПРЯМКУ (огляд літератури)

О. А. Костогрыз¹, Д. О. Зубов²

¹ДУ “Інститут травматології та ортопедії АМН України”, м. Київ

²ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, м. Київ

TOPICAL QUESTIONS ABOUT CELL THERAPY FOR ARTICULAR CARTILAGE DEFECTS: PROBLEMS AND TRENDS (literature review)

O. A. Kostogryz, D. O. Zubov

The review is dedicated to topical questions and approaches to treatment of articular cartilage defects by means of cell therapy methods. The alternative autologous cell sources, the ways of their chondrogenic differentiation, the optimal carriers for cartilage tissue graft forming as well as pre- and posttransplantation perspectives of wound bed management and patient's rehabilitation are considered.

Key words: cartilage, articular cartilage defect, cell therapy.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ДЕФЕКТОВ СУСТАВНОГО ХРЯЦЦА: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ НАПРАВЛЕНИЯ (обзор литературы)

О. А. Костогрыз, Д. О. Зубов

Обзор посвящен актуальным вопросам и подходам к лечению дефектов суставного хряща методами клеточной терапии. Рассматриваются существующие альтернативные аутологические источники клеточного материала, пути его хондрогенной дифференцировки, оптимальные носители для формирования трансплантата хрящевой ткани, а также пред- и посттрансплантационные аспекты ведения раневого ложа и реабилитации пациента.

Ключевые слова: хрящ, дефект суставного хряща, клеточная терапия.

Як відомо, хрящова тканина має знижену здатність до регенерації. У ній відсутні кровоносні та лімфатичні судини, нерви, а живлення здійснюється дифузно за рахунок синовіальної рідини. Тому післятравматичні дефекти суглобового хряща практично самостійно не відновлюються і з часом розвивається остеоартроз, а в майбутньому втрачається функція суглоба.

У зв'язку з цим аутологічна трансплантація хондроцитів (АТХ) відносно міцно закріпилась в ортопедії і направлена на лікування дефектів суглобового хряща [16]. На сьогоднішній день цим методом лікування вже скористалось більше 10 тис. чоловік. В усьому світі різні клітинні препарати (клітинний сервіс) знаходяться на різних етапах застосування: від комерційних препаратів, що продаються та дозволені FDA (Food and Drug Administration — державна організація, що контролює виробництво харчових і лікарських препаратів) у США, до препаратів на різних стадіях клінічного дослідження [19], а саме:

Carticel[®] (Genzyme corp., США) — заснований на АТХ-технології, дозволений до застосування FDA, вартість лікування — \$26 000, що включає в себе артроскопічну біопсію із ненавантажувальної ділянки хряща колінного суглоба, культивування (процес вирощування клітин поза організмом) та масштабування (процес нарощування (збільшення кількості) клітин поза організмом) в умовах GMP — лабораторій (Good Manufacturing Practice — звід норм, правил та вимог до лабораторного виробництва лікарських препаратів), артроскопічну імплантацію 12 млн. клітин в 0,4 мл культурального середовища в ділянку дефекта з підшиванням клаптя аутоперіоста або колагенової мебрани. Препарат призначений для лікування дефектів суглобового хряща колінного суглоба, спричинених гострою або хронічною травмою; препарат не призначений для лікування пацієнтів з остеоартрозом;

Cartilink^{™-1} (Interface Biotech A/S, Данія) — АТХ-технологія, багатоцентрові клінічні дослідження — III фаза;

Cartilink™-2 (Interface Biotech A/S, Данія) — АТХ-технологія під основу з колагенової мембрани, багатоцентрові клінічні дослідження — III фаза;

Chondrogen™ (Osiris Therapeutics, Inc., США) — використання мезенхімальних стромальних клітин (МСК), I фаза клінічного дослідження;

ChondroCelect™ (TiGenix N. V., Бельгія) — АТХ-технологія, III фаза клінічного дослідження;

BioSeed®-C (BioTissue Technologies, Німеччина, Швейцарія, Італія) — АТХ-технологія + оригінальна основа, широкі клінічні дослідження;

Chondrotransplant®DISK (Co.Don AG, Австрія, Бельгія, Іран, Сінгапур, Швейцарія, США) — корекція патології хрящової тканини, міжхребцевих дисків за допомогою аутологічних хондроцитів;

Cartipatch™ (TBF Tissue Engineering, Франція) — АТХ-технологія + агарозно/альгінатний тривимірний матрикс, багатоцентрові клінічні дослідження — II фаза;

Isto Technologies, США; Millenium-Biologix, Канада.

Пацієнти направляються на АТХ після ряду попередніх неефективних хірургічних втручань з приводу дефекта суглобового хряща. Якщо у пацієнта залишаються симптоми, а також пацієнт і хірург вирішують, що АТХ є найкращою альтернативою, то планується артроскопічна біопсія.

Показання до цієї процедури ще повністю не узгоджені. Вважається ідеальним, якщо вік пацієнта становить 15–55 років, в анамнезі — повношаровий локалізований дефект виростка стегна, але неушкоджений мениск та немає генералізованої хондромалії і порушень осі нижньої кінцівки; готовність та здатність пацієнта до потужної реабілітації (до 12 місяців). АТХ не рекомендована для пацієнтів з нестабільністю в колінному суглобі та пацієнтам, чутливим до матеріалів телячого походження або які мають алергію на відповідні антибіотики, а також дітям і для застосування на інших суглобах, окрім як на колінному.

На сьогоднішній день повністю незадовільні результати застосування АТХ становлять близько 10 % [3]. Два найбільш поширених ускладнення — лізіс транспланта та розвиток фіброзу в ділянці дефекта й адгезії з поверненням больового синдрому та блокуванням суглоба. Інші потенційні ускладнення: утворення післяопераційної гематоми, синовіт та ранева інфекція [1].

При АТХ клітини трансплантуються в ділянку дефекта хряща і спонукають до формування тканини, що заміщує гіаліновий хрящ [6]. Для культивування хрящових клітин, з невантажувальної поверхні суглобового хряща забирається фрагмент неушкодженого хряща при первинному хірургічному втручанні. При цьому вважається, що сама процедура забору веде до uszkodження хряща і сприяє розвитку остеоартрозу, тому забір матеріалу роблять з країв суглобового хряща, прилеглих до дефекту [7]. У процесі шеститижневої експансії (нарощування клітин на поверхні культурального посуду) *in vitro* виділені хондроцити змінюють свій фенотип на близький до фібробластоподібних клітин, що не здатні продукувати відповідний хрящовий матрикс, як у нормальному суглобовому хрящі [4]. Цей феномен описаний як дедиференціювання хондроцитів *in vitro* (рис. 1) [8, 14].

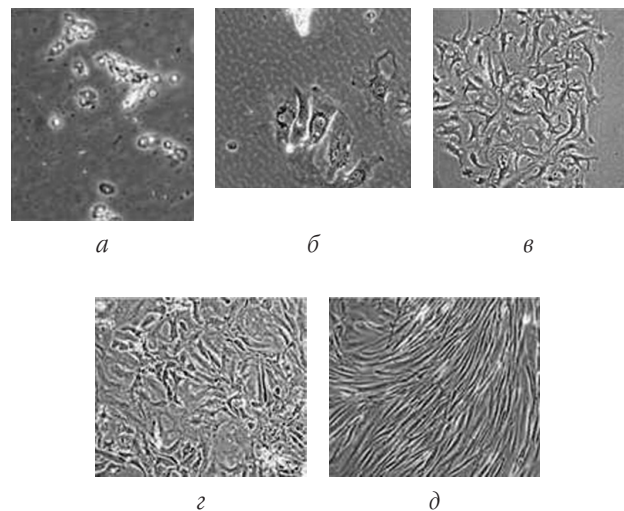


Рис. 1. Етапи культивування та дедиференціювання хондроцитів суглобового хряща людини *in vitro* від первинно ізольованих хондроцитів (ХЦ) до субкультивованих фібробластодібних клітин; фазово-контрастна мікроскопія:

a — первинно ізольовані хондроцити. $\times 200$; *b* — первинна культура. $\times 200$; *c* — первинна культура. $\times 100$; *d* — субкультивовані ХЦ. $\times 100$

У зв'язку з цим були здійснені намагання замінити культивовані хондроцити із хряща невантажувальної ділянки uszkodженої суглобової поверхні на *мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини* (МСК), які, можна, легко забрати із кісткового мозку і успішно піддати експансії в одношаровій культурі.

Деякі автори у своїх роботах називають МСК запропонованим А. Carlan у 1991 р. терміном — *мезенхімальні стовбурові клітини* [2] (попередньо О.Я. Фріденштейн з колегами понад 40 років тому охарактеризував ці клітини як *колонієутворюючі одиниці фібробластів* (КУОФ) [20, 21]. Але з 2006 р. за рекомендацією Комітету з мезенхімальних і тканинних стовбурових клітин при Міжнародній спілці з клітинної терапії (International Society for Cellular Therapy — ISCT) запропоновано вживати термін *мезенхімальні стромальні клітини* (МСК), під яким розуміють культивовані клітинні мезенхімальні, а не гемопоетичні лінії, отримані як із строми кісткового мозку, так і з інших тканин (наприклад, підшкірно-жирова клітковина, дерма, у тому числі й дедиференційовані *in vitro* активні проліферуючі фібробластоподібні клітини хряща) і які відповідають трьом мінімальним ідентифікаційним критеріям:

- 1) адгезія до пластику за стандартних умов культивування;
- 2) специфічна експресія поверхневих клітинних антигенів — індивідуальний “портрет” тієї чи іншої клітини, яка складається із певних молекул, що знаходяться на поверхні клітини (позитивна експресія CD105, CD73, CD90 і негативна CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD79 α або CD19, HLA-DR);
- 3) потенціал до диференціювання хондробластів *in vitro* в остеобласти, адіпоцити та хондробласти [13].

Для тканинноінженерійного моделювання хряща *in vitro* культивовані МСК засіваються на тривимірні основи — із полі-*L*-молочної, полігліколієвої, гіалуронової кислоти, полієфіуретанові піни, або ж біогелі — колагенові, фібринові, агарозні, алгінатні. У присутності білків із сім'ї трансформуючих факторів росту, таких як TGF- β 1, TGF- β 3, а також кісткових морфогенетичних білків — BMP-2, BMP-6 та BMP-9, МСК диференціюються в хондроцитоподібні клітини, що продукують хондроспецифічний позаклітинний матрикс [5, 17]. Однак внутрішньоклітинні сигнальні події шляхів хондрогенного диференціювання МСК все ще не повністю розкрито.

При використанні МСК для регенерації хряща *in vivo* залишається нез'ясованим той факт, чи є необхідність їхнього попереднього диференціювання *in vitro* перед трансплантацією в хрящовий дефект або у навколишнє мікрооточення, чи в ділянці трансплантації самостійно може індукувати хондрогенний фенотип некомітованих (недиференційованих) МСК. Так, наприклад, дефекти хряща на виростках стегна у собаки були успішно заміщені за допомогою колагенового геля, засіяного некомітованими МСК. Гістологічні дослідження двотижневого трансплантата виявили утворення фіброзного хряща, який містив хондроспецифічний колаген II типу. Відновлена тканина дефекту, за допомогою трансплантованих клітин, хоч і показала задовільні біомеханічні властивості, тим не менше, утворений хрящ виявився за структурою найбільш близьким до нативного, чим у незасіяних клітинами контрольних дефектах [11].

Нещодавно було показано, що аутологічні МСК були успішно трансплантовані в хрящові дефекти у людини: 12 пацієнтів, кожний з ізольованим хрящовим дефектом медіального виростка стегна, яким виконана висока остеотомія великогомілкової кістки; МСК забирали із ділянки остеотомії, культивували і потім трансплантували у хрящові дефекти при повторному хірургічному втручанні. У пацієнтів були досягнуті позитивні клінічні результати впродовж 42-х тижнів і артроскопічні та гістологічні спостереження трансплантатів виявили утворення більш функціонально активної хрящової тканини, ніж у контрольній безклітинній групі [10]. Незважаючи на такі багатобіаючі результати, існує і багато невирішених біологічних та технічних проблем у застосуванні МСК для регенерації хряща *in vitro*. Так, було показано, що МСК після трансплантації трансформуються в гіпертрофовані хондроцити, трансдиференціюються в остеобласти або заміщуються остеобlastами із субхондріальної кістки [18]. J. Quintavalla зі співавт. імплантували трансплантати, засіяні міченими флуоресцентними мітками МСК, в остеохондріальні дефекти для вивчення можливості ідентифікації трансплантованих клітин за 2 тижні в ділянці їхньої імплантації. Було виявлено, що більшість МСК або мігрують у субхондріальну кістку, або зазнають апоптозу [9].

Отже, основними актуальними питаннями, що виникають при розробці технологій культивування, нарощування і трансплантації хондроцитоподібних клітин з використанням тканинної інженерії для заміщення дефектів хряща є такі:

1. *Альтернативні джерела аутологічних клітин*: які саме МСК можуть бути найбільш ефективними в аспекті

in vitro хондрогенеза і заміщення дефектів хряща тканиною, близькою до нативного хряща?

Потенційно ними можуть бути:

- 1) МСК кісткового мозку;
- 2) прогеніторні клітини хряща;
- 3) періцити із дерми;
- 4) стромально-судинна фракція клітин із жирової тканини.

При виборі варіанта клітин, без сумніву, необхідно керуватись доступністю клітинного матеріалу в кожному конкретному випадку. Наприклад, якщо мова йде про хірургічне втручання на колінному суглобі, то доцільно забрати паралельно з операцією біоптат хряща із прилеглої до дефекту зони суглобової поверхні. Також, логічно було б припустити, що найбільш придатними клітинами для заміщення дефектів хряща є прогеніторні клітинні лінії, отримані із самого хряща, які в нормі реалізують *in vivo* свої гістобластичні потенції до хондрогенезу.

2. *Які клітини доцільно пересаджувати в місце дефекту хряща?*

Недиференційовані МСК (з припущенням, що тканинне мікрооточення в ділянці трансплантації спонукає пересаджені клітини до індукції хондрогенезу), або МСК, що отримали сигнал до диференціювання в хондроцити в культурі або ж у процесі приготування основи, що містить, окрім клітин, екзогенні фактори росту та фактори диференціювання за хондрогенним шляхом.

3. *Проблема повної і щільної фіксації трансплантата до поверхні дефекта*: яким чином тривимірна основа з клітинами може бути інтегрована і адгезована до раневого ложа по всій поверхні дефекта?

Паралельно необхідно визначитися з тим, що доцільніше: пересаджувати основу з клітинами із завчасно змодельованою формою дефекта (виготовлення основи за шаблоном або за формою дефекта безпосередньо перед операцією) або самоорганізація трансплантата безпосередньо в дефекті при з'єднанні компонентів основи та клітин. З цього питання цікавою є розроблена Johns Hopkins University, Baltimore (Maryland, США), інноваційна фотополімеризуюча основа на основі хондроїтинсульфат-(мет)акрілатових гідрогелів, імпрегнованих клітинами, що самоорганізуються в ділянці дефекта і приймають його форму, також вона утворює в момент фотополімеризації ковалентний хімічний зв'язок (мет)-акрілатових груп полімера й амінокислотних груп колагенових білків раневого ложа [15].

Також цікавим є підхід швейцарських клініцистів із відділу хірургії і біомедицини Базельського університетського госпіталю [3], які продемонстрували, що експансія хондроцитів у моношаровій культурі з наступним короткочасовим культивуванням в агрегатах (перед посівом на основу) може бути дієвою стратегією при моделюванні хрящових трансплантатів за умов дефіциту клітинного матеріалу.

Для вирішення цих питань необхідний подальший прогрес у розвитку методів трансплантації і розробки функціональних біоматеріалів, здатних контролювати хондрогенне диференціювання в поверхневих шарах трансплантата і сприяти функціональній інтеграції більш глибоких шарів трансплантата в прилеглу кісткову тканину.



Рис. 2. Схема основних факторів, що сприяють успішному результату клітинної терапії травматичних ушкоджень хрящової тканини:

1 — вид патології; 2 — біотехнологічні аспекти моделювання хрящового еквівалента; 3 — клінічні фактори

На рис. 2 наведена схема основних етапів успішної трансплантації хондроцитів при травматичних дефектах суглобового хряща.

Як видно з рисунка, існують три основні групи факторів, що впливають на успішний результат клітинної терапії:

1 — клітини застосовуються виключно при травматичних ушкодженнях;

2 — оптимальний підбір клітинних джерел, а також якість та кількість нарощуваних клітин;

3 — відповідна передімплантаційна підготовка раневого ложа та постімплантаційна реабілітація пацієнта.

Нехтуючи однією з цих ключових груп факторів, неможливо отримати добрий клінічний результат і формування в дефекті відповідного гіаліноподібного або ж гіалінового хряща.

Література

1. Деев Р.В. Анализ рынка клеточных препаратов для коррекции патологии скелетных тканей / Р.В. Деев // Клеточная трансплантация и тканевая инженерия. — 2006. — № 2 (4). — С. 78–83.
2. Фриденштейн А.Я. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники / А.Я. Фриденштейн, К.С. Лалькина. — М.: Медицина, 1973. — 222 с.
3. Фриденштейн А.Я. Проллиферативные и дифференциальные потенции скелетных костномозговых колониеобразующих клеток / Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. // Цитология. — 1986. — Т. 28, № 3. — С. 341–349.
4. Borg J. Cartilage transplants: after the media hype — what are the facts about autologous chondrocyte transplantation (ACT) / J. Borg, F. Haddad // Sports Injury Bulletin (on line). — 2008. — Vol. 12. — Режим доступу до журн.: <http://www.sportsinjurybulletin.com/archive/cartilage-transplants.html>.

5. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells / A.I. Caplan // J. Orthop. Res. — 1991. — Vol. 9. — P. 64–650.
6. Cartilage tissue engineering using pre-aggregated human articular chondrocytes / Wolf F., Candrian C., Wendt D. [et al.] // Europ. Cells and Materials. — 2008. — Vol. 16. — P. 92–99.
7. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes / Marlovits S., Hombauer M., Truppe M. [et al.] // J. Bone Jt Surg. Br. — 2004. — Vol. 86, № 2. — P. 286–295.
8. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix / Kasten P., Luginbuhl R., van Griensven M. [et al.] // Biomaterials. — 2003. — Vol. 24, № 15. — P. 2593–2603.
9. Effectiveness of autologous chondrocyte transplantation for hyaline cartilage defects in knees: a rapid and systematic review / Jobanputra P., Parry D., Fry-Smith A. [et al.] // Health Technol. Assess. — 2001. — Vol. 5, № 11. — P. 1–57.
10. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee / C.R. Lee, A.J. Grodzinsky, H.P. Hsu [et al.] // J. Orthop. Res. — 2000. — Vol. 18, № 5. — P. 790–799.
11. Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes *in vitro* / Binette F., McQuaid D. P., Haudenschild D.R. [et al.] // J. Orthop. Res. — 1998. — Vol. 16, № 2. — P. 207–216.
12. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects / Quantavalla J., Uzeil-Fusi S., Yin J. [et al.] // Biomaterials. — 2002. — Vol. 23, № 1. — P. 109–119.
13. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees / Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T. [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. — 2002. — Vol. 10, № 3. — P. 199–206.
14. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage / Wakitani S., Goto T., Pineda S.J. [et al.] // J. Bone Jt Surg. Am. — 1994. — Vol. 76. — P. 579–592.
15. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection / Ryan J.M., Barry F.P., Murphy J.M. [et al.] // J. Inflamm. — 2005. — Vol. 2, № 8. — P. 1–11. — Режим доступу до журн.: <http://www.journal-inflammation.com/content/2/1/8>.
16. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / Dominici M., LeBlanc K., Mueller I. [et al.] // Cytotherapy. — 2006. — Vol. 8, № 4. — P. 315–317.
17. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. I. Dedifferentiation of cartilage cells / Holtzer H., Abbott J., Lash J. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1960. — Vol. 46. — P. 1533–1542.
18. Transdermal photopolymerization of PEO-based injectable hydrogels for tissue engineering cartilage / Elisseeff J., Anseth K., McIntosh W. [et al.] // Plast. and Rec. Sur. — 1999. — Vol. 104, № 4. — P. 1014–1022.
19. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation / Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A. [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 331, № 14. — P. 889–895.
20. Tufan A.C. Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions / A.C. Tufan, R.S. Tuan // FASEB J. — 2001. — Vol. 15, № 8. — P. 1436–1438.
21. Wakitani S. Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect / S. Wakitani, T. Yamamoto // Microsc. Res. Tech. — 2002. — Vol. 58, № 1. — P. 14–18.