

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ: БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Васильев Р.Г.^{1,3}, Оксимец В.М.^{2,3}, Зубов Д.А.^{1,3}, Новикова С.Н.¹

¹ ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»,

² ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины»,

³ Медицинская компания *ilaya*®, Киев

Резюме. В обзоре рассматривается современное состояние проблемы лечения нарушений репаративного остеогенеза и дефектов костной ткани. Обсуждаются возможности, эффективность, недостатки и ограничения существующих хирургических методов восстановления целостности костной ткани. Обосновывается необходимость разработки новых методов лечения, основанных на принципах регенеративной медицины, в частности – на использовании клеточной терапии и тканевой инженерии. Даны общие представления о стволовых и прогениторных клетках, приведена существующая на сегодняшний день их классификация. Особое внимание уделено мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам как наиболее перспективному клеточному типу для использования в травматологии и ортопедии. Рассматривается проблема выбора материала-носителя для трансплантации клеток и создания ткане-инженерных эквивалентов кости. Приводятся экспериментальные и клинические данные по использованию методов клеточной терапии и тканевой инженерии для лечения нарушений репаративного остеогенеза и восстановления дефектов костной ткани.

Ключевые слова: репаративный остеогенез, дефекты костной ткани, стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), клеточная терапия, тканевая инженерия, регенеративная медицина.

Лечение нарушений посттравматического репаративного остеогенеза и дефектов костной ткани по-прежнему остается актуальной проблемой, для решения которой требуется уточнить целый ряд важных аспектов. Несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению данной проблемы, частота неудовлетворительных исходов лечения остается достаточно высокой. При нарушениях репаративного остеогенеза эта цифра достигает 15%, а при дефектах костной ткани – в среднем 10,5% (El-Rosasy M., 2007; Brydone A., 2010). Среди причин, нарушающих заживление переломов костей, выделяют три основные группы: причины, негативно влияющие на функциональное состояние костной ткани до травмы; причины, связанные с самой травмой; причины, которые влияют на течение репаративного остеогенеза в процессе лечения. Наименее изученной в настоящее время является вторая группа. Несмотря на то, что значительное количество исследователей в своих работах указывают на наличие взаимосвязи между энергией травмирующего агента и течением репаративного остеогенеза, детального изучения этой взаимосвязи до настоящего времени не про-

водилось. Также в литературе отсутствуют работы, посвященные изучению состояния клеточных источников остеорепарации в зависимости от прикладываемой к костной ткани энергии травмирующего агента. Изучение морфофункциональных изменений, развивающихся в костной ткани и клетках, принимающих участие в остеорепаративных процессах, позволит более глубоко понять процессы, происходящие в области костной раны, и определить на клеточном уровне причины нарушения формирования специфического костного регенерата.

«Золотым стандартом» в восстановлении дефектов костной ткани является трансплантация аутологичной кости. Однако данный метод имеет недостатки: 1) ограниченный объем аутологичного костного материала, доступного для забора; 2) необходимость дополнительного хирургического вмешательства для получения ауто трансплантата, которое к тому же может приводить к осложнениям (боль, инфекция, возникновение донорской раны и т.д.).

В качестве альтернативы аутологичной трансплантации костной ткани разрабатывались методы получения (соответствующей обработки) и

трансплантации алло- и ксенокости. Также разрабатываются синтетические остеопластические материалы. Результаты использования данных подходов для значительных дефектов кости можно считать неудовлетворительными. Общим недостатком алло-, ксено- и синтетических остеопластических материалов является отсутствие в них главного активного компонента костной ткани – собственно остеогенных клеток.

Среди причин неудовлетворительных исходов лечения дефектов костной ткани при использовании костных ауто- и аллотрансплантатов является отсутствие сращения трансплантата с костной тканью реципиентного ложа, их частичный или полный лизис. Частичный лизис костных ауто-трансплантатов связывают с гибелью значительного количества клеток костной ткани в трансплантате, а лизис костных аллотрансплантатов и отсутствие их сращения с костной тканью – с недостаточным пролиферативным потенциалом остеогенных клеток реципиентного ложа.

В то же время последние научные и клинические работы показывают, что развитие современной биомедицинской науки позволяет включить в арсенал врача целый комплекс биотехнологических методов с использованием подходов клеточной терапии и тканевой инженерии для коррекции множества патологических процессов, в том числе и для лечения длительно несрастающихся переломов, асептических (аваскулярных) некрозов и дефектов костей критического размера.

Посттравматические дефекты костной ткани и методы их лечения

Посттравматические дефекты костной ткани занимают особое место среди причин, нарушающих течение остеорепаративных процессов. Г.И. Лаврищева и соавт. (Лаврищева Г.И., 1996) показали, что если расстояние между костными фрагментами превышает 3-5 мм, то формирование костной мозоли не происходит и целостность кости не восстанавливается.

Дефекты костей отмечаются у 0,4% от всех пострадавших с переломами костей. Наиболее часто дефекты костей образуются при открытых высокоэнергетических травмах и составляют 11,4% от всех пострадавших с открытыми переломами костей (Keating J.F., 2005). 69% всех дефектов – это дефекты диафизов длинных костей, среди них 68% – дефекты большеберцовой кости и 22% – дефекты бедренной ко-

сти (Keating J.F., 2005). По данным Salgado A.J. с соавт. (Salgado A.J., 2004) и Brydone A.S. с соавт. (Brydone A.S., 2010), ежегодно примерно в 1 миллионе случаев скелетной травмы образуются костные дефекты, размеры которых являются слишком большими и требуют осуществления костнопластических операций. Выбор способа восполнения дефекта костной ткани зависит от вида дефекта и его размеров.

Наиболее часто при незначительных дефектах костной ткани в качестве остеозамещающего материала используют аутокость (Buono E.M., 2009). Использование губчатых костных ауто-трансплантатов считается наиболее оптимальным, т.к. они обладают остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами, безопасны для пациента, дешевы и легкодоступны. Недостатком ауто-трансплантатов является их ограниченный объем, что не позволяет восполнять значительные дефекты костей, и необходимость дополнительного хирургического вмешательства при заборе трансплантата (Laurie S.W., 1984; Niikura T., 2008). В литературе имеются данные о том, что у 3,2% больных, которым осуществлялась костная ауто-трансплантация, наблюдалось полное рассасывание ауто-трансплантата, а у 9,3% больных – его частичный лизис (Mitchell S.E., 2010). В 5-7% случаев в области забора трансплантата развивались инфекционные осложнения, а у 30% больных в этой области длительное время сохранялись парестезии (Arrington E., 1996; Thomas A., 2008).

Лечение значительных по протяжению дефектов трубчатых костей представляет собой сложную проблему, к решению которой различные авторы подходят по-разному. Так некоторые предлагают использовать невааскуляризованную аутологичную малоберцовую кость (Grimer R.J., 2000). В то же время они отмечают, что при использовании данного способа замещения костного дефекта почти у 5% больных происходит полный, а у 10,3% больных частичный лизис трансплантата. У 12% больных отсутствует сращение между дистальным участком трансплантата и костным фрагментом. В связи с ограниченным объемом костного ауто-трансплантата в качестве его альтернативы используют костный алло- или ксенотрансплантат, что позволяет решить проблему, связанную с объемом костно-замещающего материала (Finkemeier C.G., 2002). При использовании аллогенных или ксеногенных костных трансплантатов возникает пробле-

ма иммунной несовместимости, которая решается посредством специальной обработки костного трансплантата – криоконсервации или лиофилизации (Finkemeier C.G., 2002). В результате такой обработки происходит устранение клеточного компонента костного трансплантата, что практически лишает его остеоиндуктивных свойств и приводит к замедлению перестройки трансплантата и формирования новой кости по сравнению с ауто трансплантатом (Finkemeier C.G., 2002). Клиническое использование аллогенных/ксеногенных трансплантатов показало, что в 14% случаев отсутствует сращение трансплантата с костью. У 8% больных, которым для замещения значительных костных дефектов использовали аллотрансплантаты, происходил полный лизис трансплантата, а у 13,1% больных – его частичный лизис (Shasha N., 2003).

Сопоставление данных клинического использования костных ауто- и аллотрансплантатов для замещения значительных дефектов трубчатых костей свидетельствует о том, что при использовании данных подходов наблюдается достаточно высокая частота неудовлетворительных исходов – лизис ауто трансплантата происходит у 5% больных, а аллотрансплантата – у 8-30%, отсутствие сращения между ауто трансплантатом и костью наблюдается в 12% случаев, а аллотрансплантата – в 14% (Shasha N., 2003; Mitchell S.E., 2010).

Процесс замещения костного дефекта при использовании костного аллотрансплантата происходит по типу «ползущего» регенерата. Постепенное проникновение клеток костной ткани в ткань трансплантата обусловлено регенераторным потенциалом клеток-предшественников, и от этого потенциала зависит, насколько быстро произойдет перестройка трансплантата и произойдет ли она вообще (Корнилов Н.В., 2000). По данным Euges K.S. и соавт. (Euges K.S., 1995), при сегментарных дефектах костей в костных фрагментах происходят различные морфологические изменения – в периферическом фрагменте происходит потеря 50% костной плотности, а в проксимальном – склерозирование костной ткани. По мнению авторов, это связано с изменениями клеточного состава кости. Эти данные косвенно свидетельствуют о том, что в костных фрагментах происходит снижение регенераторного потенциала клеток-предшественников, что, в свою очередь, оказывает влияние на процесс

сращения костного трансплантата с костью и его перестройку.

С целью активации остеогенеза при использовании аллогенных трансплантатов в экспериментах на животных использовали BMP (bone morphogenetic protein, костный морфогенетический белок). Использование аллотрансплантата совместно с BMP позволило добиться положительных результатов у 92% животных, но у 8% произошел лизис аллотрансплантата (Nilsson O., 1986).

Наряду с ауто- и аллотрансплантацией для замещения значительных дефектов диафизов костей в странах СНГ и, в меньшей мере, в странах дальнего зарубежья используется метод компрессионно-дистракционного остеосинтеза, который был разработан Илизаровым Г.А. Однако использование данного метода сопряжено с рядом проблем – длительностью лечения и развитием ряда осложнений. Длительность лечения дефектов длинных костей, по данным различных авторов, составляла от 20,7-24,5 (Blum A., 2010) до 34,8-43,5 мес. (Sen C., 2006; El-Rosasy M., 2007). Неудовлетворительные результаты при использовании компрессионно-дистракционного остеосинтеза для замещения костного дефекта составляют около 7-9,8% (Sen C., 2006; El-Rosasy M., 2007). Неудачи при лечении значительных дефектов диафизов костей в 10% случаев связывают с замедлением формирования костного регенерата, в 40% – с развитием инфекционных процессов, в 5% – с переломами костного регенерата и в 5-11% случаев – с рефрактурами в месте сопоставления костных фрагментов (Rajasekaran S., 2009; Ryzewicz M., 2009). У 20% больных для достижения сращения костных фрагментов потребовалось выполнение повторных операций (Ryzewicz M., 2009).

В течение последних 30 лет ведется активная разработка и изучение возможности использования в качестве трансплантатов материалов, полученных из синтетических или естественных биоматериалов (Brydone A., 2010). В литературе имеется значительное количество экспериментальных работ, в которых показано наличие остеоиндуктивных и/или остеоиндуктивных свойств у синтетического гидроксиапатита (ГА) (Дедух Н.В., 2006; Lutolf M., 2003), ГА из кораллов (Glowacki J., 1995), β-трикальцийфосфата и пористого двухфазного фосфата кальция (Yuan H., 2002; Le Nihouannen, 2005; Fellah B., 2008), цементируемого фосфата

кальция (Thomas A., 2008), пористого биоактивного титана (Fujibayashi S., 2004) и др. Однако остеогенные и остеоиндуктивные свойства этих материалов значительно уступают таковым костного аутографта (Fellah B., 2008; Thomas A., 2008). Использование синтетических заменителей в клинике не дало ожидаемого результата. При заполнении дефектов проксимального метаэпифиза большеберцовой кости кальций-фосфатным цементом замещение костного дефекта в среднем происходило в течение 23 мес. и зависело от объема дефекта костной ткани, а неудовлетворительные исходы лечения составили 14% (Oztürkmen Y., 2010).

Для улучшения остеоиндуктивных свойств синтетических материалов в экспериментах осуществляли их насыщение различными факторами роста. Geesink R. и соавт. (Geesink R., 1999) показали, что насыщение ГА BMP-7 в супрафизиологической концентрации повышает остеоиндуктивные свойства ГА. Такие же результаты были получены другими авторами (Boyne P., 2001; Lutolf M., 2003). К недостаткам данного способа повышения остеоиндуктивности синтетических материалов можно отнести высокую стоимость рекомбинантных факторов роста, крайне незначительное время, в течение которого они выполняют свою функцию в виду быстрой деградации протеолитическими ферментами, что обуславливает необходимость разработки технологии пролонгации действия этих факторов. Thomas A. и соавт. (Thomas A., 2008) для повышения индуктивных свойств керамических трансплантатов и уменьшения объема костного аутографта использовали смесь кальций-фосфатного цемента и аутокости из крыла подвздошной кости в соотношении 2:1. Результаты клинического использования авторами данной смеси при лечении дефектов большеберцовой кости показали, что процесс перестройки трансплантата происходит в 1,5-2 раза дольше, чем костного аутографта, а неудовлетворительные исходы лечения составили 8,2%.

Регенеративная медицина: методы клеточной терапии и тканевой инженерии. Общие представления о стволовых и прогениторных клетках

Достижения в области молекулярной и клеточной биологии привели к появлению нового раздела в медицине, получившего название регенеративная медицина. Принципиальным отличием данного подхода от реконструктивно-восста-

новительной медицины является его направленность на стимуляцию процессов репаративной регенерации поврежденных органов и тканей, как с использованием внешних факторов, так и посредством активации собственных ресурсов организма (Audet G., 2009).

Наиболее перспективными направлениями в области регенеративной медицины считаются клеточная терапия и тканевая инженерия. Клеточная терапия – трансплантация клеток, часто предварительно культивированных *in vitro*, для возмещения утраченных или дефектных клеточных популяций, либо для стимуляции собственных регенераторных процессов организма (Bajada S., 2008). Тканевая инженерия – создание *in vitro* на основе клеток и молекул внеклеточного матрикса живых эквивалентов органов и тканей для их последующей трансплантации (Lanza R., 1997).

Ведутся интенсивные экспериментальные, преклинические и клинические исследования возможности применения клеточной терапии для лечения инсульта (Chen J., 2001), инфаркта миокарда (Jackson K., 2001), критической ишемии нижних конечностей (Ishikawa M., 2004), повреждений спинного мозга (Sykova E., 2006) и других заболеваний (Redmond D., 2007).

С использованием методов тканевой инженерии уже получены и используются живые эквиваленты кожи (для лечения обширных ожогов, незаживающих ран и трофических язв) (Loss M., 2000), хряща (травматические повреждения суставов) (Steinwachs M., 2007) и трахеи (Macchiarini P., 2004). Также идут работы над созданием биоинженерных кровеносных сосудов (Baguneid M., 2006), клапанов сердца (Ахмедов Д., 2009), роговицы (Griffith M., 2002) и др.

Как клеточная терапия, так и тканевая инженерия требуют использования большого количества клеток, при этом часто различных типов. Далеко не все из существующих в человеческом организме типов дифференцированных клеток могут быть получены в достаточном количестве в связи либо с их неспособностью к размножению (кардиомиоциты, зрелые нейроны), либо с трудностью их изоляции и культивирования (эндотелиальные, глиальные клетки). Таким образом, основным инструментом регенеративной медицины становятся стволовые клетки (Audet G., 2009).

Стволовые клетки (СК) являются структурно-функциональными единицами эволюции, раз-

вития и регенерации организмов (Weissman I., 2000). В зависимости от стадии развития организма выделяют эмбриональные, фетальные и постнатальные (взрослые) стволовые клетки (Audet G., 2009). Использование эмбриональных и фетальных СК связано с целым рядом этических и юридических проблем. Кроме того данные СК не возможно применять на аутологичной основе (пожалуй за исключением СК, выделяемых из пуповины и пуповинной крови), что поднимает вопросы иммунологической совместимости и тестирования донорского материала на вирусные и бактериальные инфекции. Таким образом, на сегодняшний день целесообразным является использование постнатальных соматических СК (выделенных из тканей и органов взрослого организма) (Audet G., 2009).

Наиболее простым, функциональным и универсальным определением СК является следующее: стволовая клетка – недифференцированная клетка, способная самообновляться на протяжении всей жизни организма и производить дифференцированных потомков одного или нескольких клеточных типов (Masters J., 2009).

Достаточно хорошо описаны и идентифицированы СК скелетной мышцы (сателлитные клетки, или миобласты) (Tajbakhsh S., 2005), гемопоэтические (Haylock D., 2007), нейральные (Reynolds B., 1992) и эпителиальные СК (Blanpain C., 2004). Более дискуссионным является статус эндотелиальных клеток-предшественников (Asahara T., 1997) и мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и костного мозга (стволовые или прогениторные клетки) (Prockop D., 2008).

В основу существующей классификации СК положен принцип их разделения по способности (потентности) клеток давать начало различным дифференцированным клеточным типам (Audet G., 2009).

Схематически СК подразделяются на:

– *тотипотентные клетки* – зигота и бластомеры до 8-ой клеточной стадии развития эмбриона (0-4 сутки от начала деления зиготы), каждая из этих клеток способна дать начало новому организму;

– *плюрипотентные клетки* – эмбриональные стволовые клетки, т.е. клетки внутренней клеточной массы (эмбриобласт, пятые сутки от начала деления зиготы) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, получаемые из постнатальных дифференцированных соматиче-

ских клеток путем гиперэкспрессии экзогенно введенных факторов плюрипотентности; автор технологии – японский ученый Shinya Yamanaka, лауреат Нобелевской премии в области физиологии и медицины 2012 г.; эти клетки способны дать начало более 200 клеточным типам трех основных зародышевых листков эмбриона;

– *мультипотентные клетки* – клетки поздних стадий развития плода, тканей взрослого организма и пуповинной крови; способны образовывать любые клетки в пределах одного зародышевого листка;

– *унипотентные клетки* – клетки, которые могут дифференцироваться только в единственный клеточный тип.

В зависимости от периода развития организма, СК подразделяются на эмбриональные стволовые клетки (embryonic stem cells), выделенные из эмбриобласта, и постнатальные соматические стволовые клетки взрослого организма (adult stem cells). Однако в некоторых странах, в том числе и в Украине, выделяют еще и фетальные стволовые клетки, выделенные из эмбрионов ранних стадий гестации до 10-12 недель (Кухарчук А.Л., 2004).

На присутствие в тканях взрослого организма недифференцированных клеток (постнатальных СК), способных к пролиферации и дифференцировке, впервые указал Максимов А.А. в 1927 году в своем учении о «мезенхимальном резерве организма». Изучая различные виды соединительной ткани, которые имеют мезенхимальное происхождение, он обратил внимание на наличие недифференцированных клеток, которые не входили в категорию обычных соединительнотканых клеток. Эти клетки прямо не участвовали в специфических функциях обмена веществ и иммунных процессах, а под влиянием различных физиологических и патологических факторов начинали «производить» фибробласты и гистиоциты. Участие недифференцированных клеток в процессах репаративной регенерации, которые во многом повторяли процессы, характерные для эмбриогенеза, позволило Максиму А.А. назвать эти клетки «зародышами во взрослом организме» или «мезенхимальным резервом организма» (Maximov A., 1927).

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки: история открытия и морфофункциональные свойства

В конце 60-х – начале 70-х годов XX столетия Фриденштейн А.Я. и Лалыкина К.С. обнару-

жили мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) в строме костного мозга (Фриденштейн А.Я., 1973). Наличие ММСК в строме костного мозга взрослого организма было подтверждено многими научными коллективами в последующие годы (Kuznetsov S., 2000; Jiang Y., 2002). Наряду с костным мозгом ММСК были выявлены практически во всех органах и тканях взрослого организма (Prockop D., 2008).

Основным источником ММСК является костный мозг (Prockop D., 2008). Содержание dormantных (спящих) ММСК в костном мозге не превышает 0,01-0,001% и с возрастом их количество уменьшается. Если у новорожденного одна ММСК приходится на 10 тыс. клеток костного мозга, то в 50 лет – на 400 тыс. клеток, а в 80 лет – на 1-2 млн. клеток (Prockop D., 2008). В костном мозге ММСК стабильно поддерживают недифференцированный фенотип и находятся в фазе G₀ клеточного цикла. Морфологически они представляют собой фибробластоподобные веретенообразные клетки (Гололобов В.Г., 2003).

До недавнего времени идентификацию ММСК осуществляли по совокупности признаков. Однако такая идентификация может оказаться недостоверной, так как в литературе нет единого мнения о характерных для ММСК признаках. Одни авторы полагают, что ММСК характеризуются иммунореактивностью к остеопонтину (ОП), проколлагену- $\alpha 1$, коллагену IV типа, ламинину, мышечному актину и CD10 (дифференцировочный антиген пре-B-лимфоцитов, гранулоцитов, фибробластов); дают отрицательные реакции с маркерами поздней дифференцировки остеобластов – остеокальцином (ОК), костным сиалопротеином (КСП) (Clark B., 1995; Prockop D., 2008), обладают низкой активностью ЩФ, содержат многочисленные лизосомы с кислой фосфатазой (КФ) и включения гликогена. Другие авторы, напротив, к маркерам ММСК относят КСП, ОК, относительно высокую активность ЩФ, и низкую экспрессию ОП (Jiang Y., 2002), а также синтезируемые клетками фактор некроза опухоли (ФНО), коллаген III типа, инсулинподобный фактор роста 1 (ИПФР-I). Ряд авторов утверждает, что единственным достоверным маркером ММСК является STRO-1⁺ (моноклональное антитело, связывающееся с поверхностным антигеном ММСК) (Oyajobi B., 1999).

Причиной столь разных мнений исследователей послужило наличие различных протоколов изоляции, культивирования, дифференцировки и

идентификации ММСК. В связи с этим, в 2006 году специальный комитет International Society for Cellular Therapy (ISCT) предложил минимальный набор критериев, которые позволяют стандартизировать идентификацию ММСК человека (Dominici M., 2006). Согласно этому предложению, для идентификации ММСК определены три минимальных критерия: 1) адгезия к пластику при стандартных условиях культивирования; 2) специфическая экспрессия поверхностных клеточных антигенов (позитивная экспрессия CD105, CD73, CD90 и негативная CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 α , или CD19, HLA-DR); 3) мультипотентный потенциал к направленной дифференциации *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондроциты.

Наряду с костным мозгом, источником ММСК может служить жировая ткань (Zuk P., 2001). В отличие от костномозговых ММСК, у клеток стромы жировой ткани отсутствовала экспрессия молекул клеточной адгезии VCAM (CD106), которая функционально связана с гемопозом. Так же, как и ММСК костного мозга, ММСК из жировой ткани, обладают способностью к остеогенной дифференцировке. В последнее время в ряде работ появились сведения о том, что МСК имеются в тканях эндодермального, мезодермального и эктодермального происхождения. По мнению авторов, эти клетки могут быть выделены из тканей органов, масштабированы в условиях *in vitro* и успешно трансплантированы.

Экспериментальные данные об использовании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для стимуляции репаративного остеогенеза. Материалы-носители (скаффолды) для тканевой инженерии костной ткани

В литературе имеется значительное количество экспериментальных работ, в которых убедительно показано, что трансплантация ММСК при лечении дефектов костей у животных запускает процессы остеогенеза и восстанавливает целостность кости (Гололобов В.Г., 2004; Wang Z., 2006; Oliveira J., 2010). Трансплантированные ММСК костного мозга обладают отчетливым индуцирующим и оптимизирующим влиянием на течение остеорепаративных процессов даже там, где посттравматический остеогенез в обычных условиях не происходит (Гололобов В.Г., 2004).

Одним из важных условий, определяющих возможность ММСК дифференцироваться по остеогенному типу и образовывать костную ткань, является создание условий для формирования клетками трехмерной структуры (Yuan J., 2007). Это достигается при помощи специальных носителей, которые выполняют функцию временного экстрацеллюлярного матрикса, на котором клетки находятся до формирования нового внеклеточного матрикса и новой костной ткани.

По современным представлениям «идеальный» костнозамещающий материал-носитель трансплантируемых клеток должен быть биологически совместимым, хорошо васкуляризоваться и обладать рядом других свойств: 1) остеоиндукцией – запускать процессы клеточной пролиферации и остеогенеза; 2) остеокондукцией – служить матрицей для образования новой костной ткани, хорошо совмещаться со скелетом организма и обладать способностью направлять рост костной ткани; 3) остеопротекцией – по своим механическим характеристикам быть способным выдерживать физиологические нагрузки кости (Salgado A., 2004). В настоящее время не существует материала, который бы отвечал всем требованиям, предъявляемым к идеальному костнозамещающему материалу.

Механические свойства носителя могут оказывать существенное влияние на дифференцировку клеток. В экспериментах было показано, что ММСК человека дифференцируются в остеогенном направлении при культивировании на субстратах с модулем жесткости, соответствующем 80 кПа (Rowlands A., 2008). Топография носителя оказывает существенное влияние на его свойства: шероховатая поверхность способствует более быстрой адгезии клеток, поры способствуют клеточной миграции, улучшают поступление питательных веществ и кислорода (Корж Н.А., 2008). Важным свойством материалов-носителей является их способность к пролонгированной биодеградации, индукции клеточной пролиферации и возможность оказывать остеогенное влияние на клетки. Быстрая биодеградация носителя способствует вымыванию клеток вместе с раневым транссудатом и не позволяет сформировать трехмерную структуру. По мнению Kuznetsov S.A. и соавт. (Kuznetsov S., 2001), для того, чтобы носитель оказывал остеогенную индукцию на ММСК, он должен иметь минеральный состав, схожий с костью.

В литературе описано огромное количество материалов-носителей для тканевой инженерии костной ткани: децеллюляризованная алло- и ксенокость, натуральные и синтетические полимеры и гидрогели на их основе, синтетические материалы на основе гидроксиапатита и др.

В основе натуральных полимеров лежат белки – альбумин, фибрин или фибриноген, коллаген, полиаминокислоты, полиамины и полисахариды. Синтетические полимерные носители содержат биodeградирующие полимеры – поли-L-молочные кислоты (ПМК), полигликолевую кислоту (ПГК), полилактид-ко-гликолид (ПЛГК) и недеградирующие полимеры: полиакрилат, этилен-винил ацетат и др. (McCullen S., 2009). Эксперименты *in vitro* показали, что носители на основе коллагена способствуют адгезии клеточных культур и связывают факторы роста. Включение в биополимерный носитель коллагена I типа способствует остеогенной дифференцировке ММСК (Wei G., 2006). В исследованиях (Татаренко-Козмина Т.Ю., 2007) было установлено, что биостабильные композитные материалы на основе полиамида, полиметилметакрилата и высокомолекулярного полиэтилена не обладают цитотоксическим эффектом и могут использоваться в качестве носителей клеточных культур. В последние годы ведутся разработки новых носителей с использованием нанотехнологий, которые позволяют создать макропористые материалы из нановолокон ПМК, покрытых ПЛГК (Wei G., 2009).

Керамические носители на основе ГА, трикальций фосфата (ТКФ), фосфата кальция ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) или карбоната кальция (CaCO_3), по данным литературы, обеспечивают адгезию и пролиферацию ММСК (Сао Х.-Y., 2006), а в сочетании с дексаметазоном их остеогенную дифференцировку (Oliveira J., 2010). Недостатком керамических носителей является их длительная биодеградация, что значительно снижает прочность кости в месте имплантации этих носителей (Чиссов В.И., 2008). В качестве клеточных носителей предлагают использовать природный морской коралл и коралловую гидроксиапатитную керамику (Сергеева Н.С., 2009). Однако исследования (Meijer G., 2007) показали, что трансплантированные клетки, которые культивировались на ГА, полученном из морских кораллов, были неспособны продуцировать костный матрикс. В ряде работ говорится о том, что оптимальным материалом в качестве клеточного носителя является фосфат кальция (Yuan J., 2007).

В то же время исследования (Haimi S., 2009a) свидетельствуют о том, что биоактивное стекло, полученное из фосфата кальция, приводит к задержке пролиферации и остеогенной дифференцировке ММСК. Проводились исследования, в которых для повышения пролиферации и остеогенной дифференцировки ММСК в биоактивную керамику добавляли ионы цинка (Haimi S., 2009). Однако желаемого эффекта получить не удалось.

В течение последних 3-4 лет ведется активная разработка композитных материалов, состоящих из биоактивной керамики и биodeградирующих синтетических полимерных материалов (Wang H., 2007). Изучение остеоиндуктивных и остеоиндуктивных свойств нано-гидроксиапатита/полиамида показали, что данный носитель не оказывает негативного воздействия на ММСК *in vitro* и обладает хорошей биосовместимостью *in vivo* (Rizzi S., 2001). Имеются сообщения о том, что хорошими биосовместимыми свойствами обладают носители, созданные на основе нано-гидроксиапатита и натуральных полимеров (хитозана и карбоксиметил целлюлозы) (Liu Yun J., 2009), поликапролактана-ТКФ в комбинации с BMP-7 (Geesink R., 1999), макропористые носители, образованные нановолокнами ПМК и апатитом (Wei G., 2006) и наноструктурированные носители, содержащие волокна желатина и костно-подобных частей апатита (Lutolf M., 2003). Также в последнее время ведется разработка клеточных носителей, представляющих собой гидрогель – субстанцию, которая формируется из органических полимеров (Rahaman M., 2005).

В течение последних 10-15 лет в экспериментальных исследованиях было показано, что альтернативой костному аутографтату могут быть синтетические материалы, содержащие остеопротекторные клетки. Crane G.M. и соавт. (Crane G., 1995) для придания синтетическим остеозамещающим материалам свойств, присущих костному аутографтату, помещали на них остеобластные клетки, полученные из костного биоптата. Однако, как отмечают сами авторы, использование остеобластных клеток было сопряжено с определенными трудностями в получении необходимого количества клеток. В последующем, для разрешения проблемы получения необходимого количества клеток, обладающих остеогенными свойствами, начали использовать ММСК (Гололобов В.Г., 2004; Сергеева Н.С., 2009; Arinzeh T., 2003; Oliveira J., 2009).

В экспериментальных исследованиях было показано, что насыщенные ММСК синтетические трансплантаты обладают выраженными остеоиндуктивными свойствами и вызывают образование костной ткани вокруг трансплантата (Adachi N., 2006; Siddappa R., 2008; Dong S., 2009).

Наличие значительного количества работ, в которых авторы предлагают в качестве носителей использовать тот или иной материал, свидетельствует о нерешенности этой проблемы, поэтому в мире продолжается поиск материалов, подходящих для использования в качестве носителей клеточных культур.

Клиническое использование методов клеточной терапии и тканевой инженерии при лечении повреждений опорно-двигательного аппарата

Несмотря на значительное количество экспериментальных работ, в которых убедительно показана высокая эффективность трансплантации ММСК при замещении дефектов длинных костей у животных, в доступной литературе встречаются единичные сообщения о клиническом использовании ММСК при лечении нарушений остеорепаративных процессов.

В 2001 году Quarto R. и соавт. (Quarto R., 2001) впервые представили результаты лечения 3 пациентов, которым с целью замещения дефектов длинных костей конечностей была выполнена трансплантация аутологичных ММСК через 15, 16 и 27 мес. после травмы. Трансплантацию клеток авторы осуществляли на макропористом гидроксиапатите, на который культивированные клетки наносились непосредственно перед трансплантацией посредством помещения носителя на определенное время в специальную среду, содержащую клеточную культуру. Как отмечают авторы, блоки макропористого гидроксиапатита изготавливались индивидуально для каждого пациента. Размеры костных дефектов у пациентов составляли 4 см (у двух) и 7 см. По данным авторов, через 2 мес. после трансплантации рентгенологически отмечалось формирование костной мозоли, а к концу 6 месяца вокруг носителя происходило формирование костной ткани. В 2004 году были опубликованы результаты лечения семилетней девочки, имевшей дефект свода черепа площадью 120 см². Для восполнения дефекта использовалась смесь аутологичной губчатой кости из подвздошного гребня (15 мл), аутологичного фибринового клея (8 мл из 315 мл по-

лученной в ходе плазмофореза плазмы крови) и 295×10^6 клеток стромально-сосудистой фракции из жировой ткани (минимально манипулированный клеточный продукт, представляющий собой суспензию клеток из ферментативно обработанной жировой ткани; содержание ММСК по данным авторов – 2-3% от общего количества клеток). Обследование методом компьютерной томографии через 3 месяца после процедуры показало формирование новой костной ткани и почти полное закрытие дефекта (Lendeckel S., 2004). В 2005 году появилось сообщение об успешном применении аутологичных ММСК при лечении 21-летнего мужчины с большим остеохондральным дефектом большеберцовой кости после септического артрита (Adachi N., 2005). В качестве клеточного носителя авторы использовали пористую керамику из гидроксиапатита. В этом же году были представлены данные о высокой клинической эффективности ММСК при лечении асептического остеонекроза головки бедренной кости (Gangji V., 2005). В 2007 году вышло сразу два сообщения о клиническом применении ММСК. Magjarevic R. и соавт. использовали аутологичные ММСК при лечении больного с раздробленным на значительном протяжении переломом бедренной кости (Magjarevic R., 2007), а Marcacci M. и соавт. представили данные обследования 3 пациентов через 6-7 лет после трансплантации ММСК по поводу дефектов длинных костей конечностей (Marcacci M., 2007). В данной работе при ангиографическом обследовании было отмечено, что костная ткань, образовавшаяся в месте трансплантации ММСК, имела хорошую васкуляризацию. Однако перестройки гидроксиапатита, на котором осуществлялась трансплантация клеток, практически не происходило. В области трансплантации при рентгенологическом обследовании наблюдалась костная ткань, внутри которой сохранялся цилиндрической формы гидроксиапатит. Имеется сообщение о восстановлении открытого перелома большеберцовой кости у военного (взрывная травма) при помощи трансплантации аллогенных ММСК костного мозга на носителе из деминерализованной аллогенной кости (коммерчески доступный продукт Trinity® Evolution™ компании Orthofix) (Fleming M.E., 2014). Авторы не приводят детального описания размеров костного дефекта, но отмечают полное заживление перелома спустя 8 месяцев после трансплантации.

В Украине в ГУ «ИНВХ им. В.К. Гусака НАМН Украины» и НИИ травматологии и ортопедии ДонНМУ им. М. Горького совместно проведены клинические испытания по использованию аутологичных культивированных ММСК костного мозга при нарушениях остеорепаративных процессов, развившихся на фоне травматических повреждений и заболеваний костной ткани. На проведение клинических исследований было получено разрешение Координационного центра трансплантации органов, тканей и клеток МОЗ Украины (Висновок щодо проведення клінічного випробування «Лікування порушених процесів репарації та регенерації при травматичних ушкодженнях та їх наслідках із застосуванням клітинно-тканинних технологій»). В ходе клинических испытаний трансплантацию ММСК инъекционным способом либо в виде трехмерного остеопрогениторного трансплантата получили 29 пациентов с длительно неконсолидирующимися переломами, 12 пациентов с дефектами костной ткани критического размера и 18 больных с аваскулярными некрозами головки бедренной кости (Гринь В.К., 2013; Oksymets V., 2013). Во всех случаях были получены хорошие или удовлетворительные результаты (заживление переломов, восстановление дефектов костной ткани, восстановление структуры головки бедренной кости и функции тазобедренного сустава). На основании проведенных клинических испытаний в 2013 г. Координационным центром трансплантации органов, тканей и клеток МОЗ Украины было выдано разрешение на использование данной технологии в клинической практике. В настоящий момент данная технология применяется в Медицинской компании ilaya (Киев, Украина), имеющей в своей структуре биотехнологическую лабораторию по культивированию клеток, соответствующую требованиям cGMP/cGTP, для лечения пациентов с критическими дефектами кости, пострадавшими в результате боевых действий на востоке Украины. В программу лечения включено 20 пострадавших, у 9 из которых на данный момент получены хорошие предварительные результаты (Oksymets V.M., 2015).

Необходимо отметить, что во всех статьях, посвященных клиническому применению клеточной терапии и тканевой инженерии, осуществляется, в основном, констатация факта использования данных технологий и высокая клиническая эффективность. Какого-либо детального описания технологии трансплантации ММСК

авторы не приводят, сообщается только о том, что трансплантация осуществлялась или инъекционным (клеточная терапия), или оперативным методом (трансплантация тканеинженерного конструкта).

Таким образом, на основании последних научных данных можно сделать вывод о перспективности развития методов клеточной терапии и тканевой инженерии для лечения нарушений процессов репаративного остеогенеза и восстановления обширных дефектов костной ткани. Основными клеточными типами, используемыми для этих целей, являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки из различных тканевых источников (преимущественно из костного мозга и жировой ткани) и коммитированные остеопрогениторные клетки периоста и эндоста. Дальнейший прогресс в данной области может быть связан с использованием эндотелиальных клеток или эндотелиальных прогениторных клеток для повышения способности трансплантата к васкуляризации или для его предварительной васкуляризации *ex vivo*. Еще одним аспектом является разработка новых синтетических остеопластических материалов и дальнейшее развитие технологии 3D биопринтинга с использованием клеток и биосовместимых материалов.

Литература

1. *Ахмедов Д.* Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии // *Клет. Транспл.* – 2009. – 4 (2). – С. 32-39.
2. *Гололобов В.Г., Деев Р.В.* Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон // *Морфология (Morphology)*. – 2003. – 123 (1). – С. 9-19.
3. *Гололобов В.Г., Дулаев А.К., Деев Р.В. и др.* Оптимизация репаративного остеогенеза трансплантацией стромальных клеток костного мозга // *Клеточная трансплантология*. – 2004. – №1. – С. 15-16.
4. *Гринь В.К., Оксимец В.М., Климовицкий В.Г. и др.* Клинические возможности клеточно-тканевых технологий при нарушениях репаративного остеогенеза // *Журнал НАМНУ*. – 2013. – 19 (3). – С. 331-338.
5. *Дедух Н.В., Аишукина Н.А., Малышкина С.В. и др.* Пористый гидроксилатапит – материал для замещения кости в участках скелета с различной физиологической нагрузкой // *Ортопедия, травматология и протезирование*. – 2006. – №1. – С. 9-13.
6. *Корж Н.А., Кладченко Л.А., Малышкина С.В.* Имплантационные материалы и остеогенез. Роль оптимизации и стимуляции в реконструкции кости // *Ортопедия, травматология и протезирование*. – 2008. – №4. – С. 5-14.
7. *Корнилов Н.В., Аврунин А.С.* Восстановление динамического равновесия в области травматического поля // *Ортопедия, травматология и протезирование*. – 2000. – № 4. – С. 77-80.
8. *Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М.* Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / Черновцы: Золоті литаври, 2004. – 505 с.
9. *Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А.* Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / М.: Медицина, 1996. – 208 с.
10. *Сергеева Н.С., Франк Г.А., Свиридова И.К. и др.* Роль аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в тканеинженерных конструкциях на основе натуральных кораллов и синтетических биоматериалов при замещении костных дефектов у животных // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2009. – 4 (4). – С. 56-64.
11. *Татаренко-Козмина Т.Ю.* Патологические механизмы применения мезенхимальных стволовых клеток на синтетических композитах для оптимизации регенерации костной ткани (лабораторно-экспериментальное исследование): автореф. дис. на соискание уч. степени докт. биол. наук: спец. 14.00.16 «Патологическая физиология» / М., 2007. – 35 с.
12. *Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С.* Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники / М.: Медицина, 1973. – 223 с.
13. *Чиссов В.И., Свиридова И.К., Сергеева Н.С. и др.* Изучение *in vivo* биосовместимости и динамики замещения дефекта голени у крыс пористыми гранулированными биокерамическими материалами // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2008. – 3. – С. 151-156.
14. *Adachi N., Ochi M., Deie M., Ito Y.* Transplant of mesenchymal stem cells and hydroxyapatite ceramics to treat severe osteochondral damage of the knee // *J. Rheumatol.* – 2006. – 33 (6). – P. 1719-1721.
15. *Arinze T.L., Peter S.J., Archambault M.P. et al.* Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 2003. – 85-A (10). – P. 1927-1935.
16. *Arrington E.D., Smith W.J., Chambers H.G. et al.* Complications of iliac crest bone graft harvesting // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 1996. – 329. – P. 300-309.
17. *Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // *Science*. – 1997. – 275. – P. 964-967.
18. *Audet G., Stanford W.L.* Stem cells and regenerative medicine / New York, NY: Humana Press, 2009. – 424 p.
19. *Baguneid M., Seifalian A.* Tissue engineering of blood vessels // *Brit. J. Surg.* – 2006. – 93. – P. 282-290.
20. *Bajada S., Mazakova I., Richardson J.B. et al.* Updates on stem cells and their application in regenerative medicine // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2008. – 2 (4). – P. 169-183.
21. *Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A. et al.* Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche // *Cell*. – 2004. – 118 (5). – P. 635-648.
22. *Blum A.L.L., Bongiovanni J.C., Morgan S.J. et al.* Complications associated with distraction osteogenesis for infected nonunion of the femoral shaft in the presence of a bone defect // *J. Bone Joint Surg. (Br)*. – 2010. – Vol. 92-B, № 4. – P. 565-570.

23. Boyne P.J. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects // J. Bone Joint Surg (Am). – 2001. – 83. – P. 146-150.
24. Brydone A.S., Meek D., Maclaine S. Bone grafting, orthopedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering // Proc. Inst. Mech. Eng. – 2010. – 224 (12). – P. 1329-1343.
25. Bueno E.M., Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration // Nature Reviews Rheumatology. – 2009. – 5 (12). – P. 685-697.
26. Cao X.-Y., Yin M.-Z., Zhang Li-Na et al. Establishment of a new model for culturing rabbit osteoblasts in vitro // Biomed. Mater. – 2006. – №1. – P. 16-19.
27. Chen J., Li Y., Wang L. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats // Stroke. – 2001. – 32. – P. 1005-1011.
28. Clark B.R., Keating A. Biology of bone marrow stroma // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1995. – 29. – P. 70-78.
29. Crane G.M., Ishaug S.L., Mikos A.G. Bone tissue engineering // Nature Medicine. – 1995. – 1 (12). – P. 1322-1324.
30. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. – 2006. – 8 (4). – P. 315-317.

Полный список литературы находится в редакции

ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ ТА ТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ ДЛЯ ВІДНОВЛЕННЯ ДЕФЕКТІВ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ: БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ТА КЛІНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Васильєв Р.Г.^{1,3}, Оксимец В.М.^{2,3},
Зубов Д.О.^{1,3}, Новикова С.М.¹

¹ ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»,
² ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В.К. Гусака НАМН України»,
³ Медична компанія *ilaya*®, Київ

Резюме. В огляді наводиться сучасний стан проблеми лікування порушень репаративного остеогенезу і дефектів кісткової тканини. Обговорюються можливості, ефективність, недоліки і обмеження існуючих хірургічних методів відновлення цілісності кісткової тканини. Обґрунтовується необхідність розробки нових методів лікування, заснованих на принципах регенеративної медицини, зокрема – на використанні клітинної терапії і тканинної інженерії. В огляді наведено загальні уявлення про стовбурові та прогеніторні клітини і наведена їх сучасна класифікація. Особливу увагу приділено мультипотентним мезенхімальним стромальним клітинам (ММСК) як найбільш перспективному клітинному типу для використання в травматології та ортопедії. Розглядається проблема вибору матеріалу-носія для трансплантації клітин і створення тканинноінженерних еквівалентів кістки. Наводяться експериментальні та клінічні дані щодо використання методів клітинної терапії і тканинної інженерії для лікування порушень репаративного остеогенезу і відновлення дефектів кісткової тканини.

Ключові слова: репаративний остеогенез, дефекти кісткової тканини, стовбурові клітини, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), клітинна терапія, тканинна інженерія, регенеративна медицина.

CELL THERAPY AND TISSUE ENGINEERING APPROACHES FOR BONE DEFECT RESTORATION: BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS AND CLINICAL RESULTS

Vasyliiev R.G.^{1,3}, Oksymets V.M.^{2,3},
Zubov D.A.^{1,3}, Novikova S.N.¹

¹ State Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine,
² State Institute of Urgent and Recovery Surgery named after V.K. Gusak, NAMS of Ukraine,
³ Medical Company *ilaya*®, Kiev

Summary. In review the current state of treatment for disorders of reparative osteogenesis and bone defects is examined. The possibilities, efficiency, disadvantages and limitations of existing surgical methods to restore the bone integrity are discussed. The necessity of development of new treatments based on the principles of regenerative medicine, in particular - on the use of cell therapy and tissue engineering is grounded. The review presents a general view on stem and progenitor cells and shows their currently existing classification. Particular attention is paid for multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) as the most promising cell type for use in traumatology and orthopedics. The problem of choice of the scaffolds for transplantation of cells and the creation of tissue-engineered bone equivalents is considered. Experimental and clinical data on the use of methods of cell therapy and tissue engineering for the treatment of impairments of reparative osteogenesis and restoration of bone defects are provided.

Key words: reparative osteogenesis, bone defects, stem cells, multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs), cell therapy, tissue engineering, regenerative medicine.