

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

<sup>1</sup>А.М. Савинцев, <sup>2</sup>А.Б. Смолянинов, <sup>1,2</sup>Д.В. Булгин, <sup>1</sup>М.А. Булатов

<sup>1</sup>ГУЗ «Городская Покровская больница»,  
главный врач – М.Н. Бахолдина;

<sup>2</sup>Центр клеточной и генной терапии, Покровский банк стволовых клеток,  
генеральный директор – д.м.н. профессор А.Б. Смолянинов  
Санкт-Петербург

Кость представляет собой живую, высоко васкуляризованную соединительную ткань, выполняющую ряд ключевых функций в организме. Она обеспечивает структурную поддержку и защиту внутренних органов, участвует в метаболизме минеральных веществ, образует пространства для кроветворной ткани (костный мозг) и обладает способностью к ремоделированию и самовосстановлению.

Кость – это плотная многокомпонентная материя, состоящая из клеточных элементов, заключенных в матрикс, образованный органическими (коллагеновые волокна, липиды, пептиды, протеины, гликопротеины, полисахариды и цитраты) и неорганическими (фосфат кальция, карбонаты, бикарбонат натрия, магнезия, фториды) соединениями [8]. Она отвечает за поддержание минерального гомеостаза и является источником гематопоэтических стволовых клеток.

С костной тканью ассоциировано большое число клеточных популяций, но наиболее важными являются остеобласты, остециты и остеокласты, которые отвечают за образование, поддержание и резорбцию кости.

Клетки, участвующие в остеогенезе, свое происхождение берут из мезенхимальных (стромальных) клеток костного мозга и находятся в эндосте и периосте (надкостнице) [11]. Количество этих клеток регулируется биохимическими сигналами молекулами в процессе ремоделирования костной ткани и восстановления костных дефектов, местное клеточное микроокружение обуславливает дифференцировку остеогенных клеток в остеобласты или хондробласты [3]. Высокая васкуляризация костной ткани обусловлена необходимостью поступления нутриентов и кислорода, требующихся в большом количестве для нормального роста и развития кости.

Нужно отметить, что костная ткань является уникальной в своей способности к восстановлению путем образования идентичной ткани на месте утраченной. Во всех остальных органах восстановление поврежденного участка происходит посредством замещения дефекта соединительной тканью.

Экспериментально доказано, что молекулярные

и клеточные механизмы репарации костной ткани после повреждения схожи с механизмами при формировании костной ткани на стадии эмбриогенеза, что свидетельствует о присутствии аналогичных механизмов, контролирующих формирование костной ткани во взрослом организме и в эмбриональном периоде [13]. В эмбрионе скопление примитивных мезенхимальных клеток может трансформироваться в костную ткань через интрамембранозную или эндохондральную оссификацию.

Интрамембранозная оссификация – процесс последовательной трансформации мезенхимальных клеток в клетки – предшественники остеогенеза (остеопрогениторные клетки) и потом в остеобласты, результатом этих последовательных превращений является формирование кости.

Эндохондральная оссификация с последующим формированием костной ткани проходит два этапа, где мезенхимальные клетки трансформируются в хондробласты, которые ложатся на коллагеновый матрикс и в последующем оссифицируются посредством внедряющихся остеобластов. У эмбриона череп и кости челюсти формируются путем интрамембранозной оссификации, с другой стороны, плечевые кости, кости таза и нижних конечностей формируются опосредованно через эндохондральную оссификацию.

Перелом кости всегда заживает путем пятиступенчатого процесса эндохондральной оссификации [3].

1. Вначале формируется гематома как результат повреждения окружающих мягких тканей, периоста (фиброзной мембраны, покрывающей большинство костных поверхностей и содержащей кровеносные сосуды) и разрыва сосудов, находящихся внутри кости.

2. В результате этих нарушений и возникновения локального некроза вокруг зоны повреждения ближайшие к месту перелома остециты погибают. В нормальных условиях метаболизм остецитов зависит от жидкости, циркулирующей внутри канальцев и являющейся производной компонентов крови. Одновременно это необходимо для репарации костной ткани, стабилизации поврежденной зоны и удаления мертвых тканей.

3. Отвечающие за процессы регенерации и восстановления макрофаги и фибробласты мигрируют в зону повреждения для удаления тканевых обломков и последующей экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса. В процессах репарации принимают участие ростовые факторы и цитокины, которые вырабатываются клеточным микроокружением в зонах повреждения. Кроме этого, мезенхимальные стволовые клетки, поступающие в зону повреждения из костного мозга и периоста, принимают в этих процессах непосредственное участие и дифференцируются в остеопрогениторные клетки.

4. Это приводит к частичному истончению периоста и формированию клеточных муфт вокруг зоны повреждения. Остеопрогениторные клетки, лежащие в непосредственной близости к неповрежденной кости, дифференцируются в остеобласты, принимают участие в формировании остеоида с последующим обызвествлением и формированием кости. Часть остеопрогениторных клеток превращается в хондробласты и формирует хрящевую ткань. Одновременно с процессами остео- и хондрогенеза происходит образование сосудов микроциркуляторного русла. Экспериментальным путем доказано, что ангиогенез костной ткани регулируется посредством остеокластов и остеопрогениторных клеток.

5. Заключительным этапом восстановления кости является формирование в ней Гаверсовых каналов.

За последнее время медицина получила большой объем научно-практических сведений о физиологической и репаративной (восстановительной) регенерации скелетных тканей. Физиологическая регенерация активно проявляется в эмбриональных тканях, иногда в тканях новорожденных, но никогда не наблюдается во взрослом организме. По всей видимости, это связано с высоким содержанием недифференцированных прогениторных клеток в тканях эмбриона и недостаточным их числом во взрослом организме (1 клетка на 10000 мезенхимальных клеток у новорожденного по сравнению с 1 клеткой на  $2 \times 10^6$  мезенхимальных клеток у 80-летнего человека) [7]. Напротив, репаративная регенерация представляет собой более быстрый по времени процесс, необходимый для выживания индивида. Процесс репаративной регенерации вовлекает воспалительный клеточный каскад, приводящий к депозиции матрикса и затем к ремоделирующим процессам, которые обуславливают регенерацию поврежденных тканей во взрослом организме. В настоящее время понимание основ репаративной регенерации в «скелетных тканях» способствует развитию тканевой инженерии в ортопедии. Тканевая инженерия подразумевает использование клеток в комплексе с биологическими или искусственными матрицами, которые направляют клетки в процессе репарации или регенерации. Эти клетки могут «управляться» при помощи специальных био-

активных молекул, ex-vivo генной трансфекцией или физическими факторами и формировать новые ткани in vitro для последующей реимплантации in vivo. Кроме того, клетки и специальные матрицы, которые включают в себя биоактивные молекулы, такие как ростовые факторы, могут комбинироваться in vivo для последующего усиления тканевой репарации. Для примера, аутологичные хондроциты, полученные путем артроскопии, могут использоваться для репарации хрящевой ткани сустава [12].

В последние годы разработаны технологии выделения ростовых факторов, таких как трансформирующий фактор- $\beta 3$  и его аналогов – костных морфогенетических протеинов – bone morphogenic proteins (BMPs) / BMP-2 [18] и BMP-7 (OP-1) [14], что позволяет использовать данные ростовые факторы в клинической практике для расширения зоны и скорости костной репарации при проведении трансплантации.

Формирование костной ткани для последующего использования в клинической практике было впервые представлено в 1965 году [16]: автор выделил BMPs, которые могли стимулировать мезенхимальные стволовые клетки в клетки предшественники остеогенеза с последующим формированием костной ткани. Человеческая cDNA BMP-7 (OP-1) была клонирована в 1990 г. Следующим был рекомбинантный человеческий остеогенный протеин-1 (recombinant human osteogenic protein-1 / rhOP-1 /) [15], индуцирующий in vivo формирование новой костной ткани, обладая схожей специфической активностью с натуральным остеогенным протеином, стимулируя пролиферацию и дифференцировку остеобластов in vitro; rhOP-1 способен индуцировать образование костной ткани посредством стимуляции мезенхимальных стволовых клеток и их дальнейшей дифференцировки в клетки-предшественники остеогенеза. Введение рекомбинантного человеческого остеогенного протеина-1 в область дефекта кости и в место перелома привело к полному восстановлению кости через 30 месяцев [6].

В исследованиях австралийских ученых, проведенных на пациентах с переломами длинных трубчатых костей, использовался рекомбинантный человеческий остеогенный протеин OP-1. У 65% больных наблюдалось полное восстановление дефекта костной ткани [6]. Интраоперационное применение клеточных технологий на основе взрослых стволовых клеток получило широкое распространение при лечении старых и многооскольчатых переломов [9, 10]. Основанием для применения данного вида терапии являются достоверные данные о содержании клеток – предшественников остеогенеза в костном мозге взрослого человека – 1 клетка на 23 000. Данная манипуляция может проводиться непосредственно у операционного стола, что позволяет незамедлительно использовать полученные клетки.

Теоретически использование взрослых клеток – предшественников остеогенеза в достаточном количестве в комбинации с подходящей матрицей, может быть более результативным, чем применение традиционной аутологичной пересадки костной ткани. Это связано с тем, что остеогенные стволовые клетки могут незамедлительно начать пролиферировать и покрывать костную неоматрицу без необходимости удаления «старой матрицы», присутствующей при традиционной аутологичной пересадки костной ткани.

С.А. Vacanti с соавторами [17] заместили поврежденную дистальную фалангу большого пальца кисти на кость, созданную путем тканевой инженерии, содержащую аутологичные остеогенные клетки-предшественники. Это была первая клиническая попытка успешного использования методов тканевой инженерии для восстановления целой кости. Результаты обнадеживающие, но, к сожалению, нет данных о функциональных результатах лечения.

Также была предпринята попытка восстановления сухожилий и связок путем применения геля, содержащего коллаген I типа и мезенхимальные стволовые клетки. Установлено, что происходит перестройка крупных коллагеновых волокон в зоне инъекции с увеличением прочности сухожилия [4, 5].

Таким образом, можно констатировать, что в настоящее время клеточные технологии активно интегрируются в клинику, и в частности в травматологию и ортопедию. Однако нужно учесть, что активность внедрения этих технологий вплотную зависит от взаимодействия специалистов различных клинических и фундаментальных медико-биологических дисциплин (цитологии, гистологии, травматологии и ортопедии, радиологии и др.). Плодотворное использование творческого потенциала этих специалистов позволит найти новые высокоэффективные методики лечения различных повреждений и заболеваний опорно-двигательной системы человека [2]. К сожалению, несмотря на большую прикладную и социальную значимость, отечественная наука не проявляет к данной проблеме должного интереса [1].

## Литература

1. Булатов, А.А. Применение костных морфогенетических белков в эксперименте и клинике / А.А. Булатов, В.И. Савельев, А.В. Калинин // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 1. – С. 46–54.
2. Дулаев, А.К. Остеогенные клетки и их использование в травматологии / А.К. Дулаев [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2003. – Т. 3, № 3. – С. 59–66.
3. Bourne, G.H. The biochemistry and physiology of bone / G.H. Bourne. – London, New York : Academic Press, 1972. – P. 2–77.
4. Butler, D. Perspectives on cell and collagen composites for tendon repair / D. Butler, H.A. Awad // Clin. Orthop. – 1999. – N 367. – P. 234–332.
5. Frank, C. Optimization of the biology of soft tissue repair / C. Frank [et al.] // J. Sci. Med. Sport. – 1999. – Vol. 2. – P. 190–210.
6. Giltaij, L.R. Osteogenic protein-1 (OP-1) in the repair of bone defects and fractures of long bones: clinical experience / L.R. Giltaij, A.S. Shimmin, G. Friedlander // Bone morphogenetic proteins. From laboratory to clinical practice. Progress in inflammation research series / ed.by S. Vukicevic, K. Sampath. – Basel : Birkhauser Verlag, 2002. – P. 193–205.
7. Haynesworth, S.E. Diminution of the number of mesenchyme stem cells as a cause for skeletal ageing / S.E. Haynesworth, V.M. Goldberg, A.I. Caplan // Musculoskeletal soft-tissue ageing: impact on mobility. – Rosemont, Ill : American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994. – P. 79–87.
8. Mazess, R.B. Direct readout of bone mineral content using radionuclide absorptiometry / R.B. Mazess, J.R. Cameron // Int. J. Appl. Radiat Isot. – 1972. – Vol. 23, N 10. – P. 471–479.
9. Muschler, G. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications / G. Muschler, R.J. Midura // Clin. Orthop. – 2002. – N 395. – P. 66–80.
10. Muschler, G.F. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells / G.F. Muschler [et al.] // Clin. Orthop. – 2003. – N 407. – P. 102–118.
11. Owen, M. Histogenesis of bone cells / M. Owen // Calcif. Tissue Res. – 1978. – Vol. 18, N 25. – P. 205–207.
12. Peterson, L. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee / Peterson L. [et al.] // Clin. Orthop. – 2000. – N 374. – P. 212–234.
13. Rosen, V. The BMP proteins in bone formation and repair / V. Rosen, R.S. Thies // Trends Genet. – 1992. – Vol. 8, N 3. – P. 97–102.
14. Sampath, T.K. Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor- $\beta$  family / T.K. Sampath [et al.] // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265. – P. 13198–13205.
15. Sampath, T.K. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro / T.K. Sampath [et al.] // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 5, N 267. – P. 20352–203062.
16. Urist, M.R. Bone formation by autoinduction / M.R. Urist // Science. – 1965. – Vol. 150. – P. 893–899.
17. Vacanti, C.A. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone / C.A. Vacanti, L.J. Bonassar, M.P. Vacanti, J. Shufflebarger // N. Engl. J. Med. – 2001. – N 344. – P. 1511–1514.
18. Wozney, J.M. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair / J.M. Wozney, V. Rosen // Clin. Orthop. – 1998. – N 346. – P. 26–37.