

Глава 15.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В СОЗДАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКВИВАЛЕНТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ

Кульнева Е.И., Коржикова С. В., Тепляшин А.С.

Введение

В 1993 году Роберт Лангер и Джозеф Ваканти обобщили и представили для широкой научной общественности основную концепцию тканевой инженерии. Она была определена как «междисциплинарная область, в которой применяются принципы инженерии и наук о живом для разработки биологических эквивалентов, поддерживающих и улучшающих функции тканей». Кроме того, они описывают три общие стратегии, которые применяются в тканевой инженерии: использование выделенных клеток или их аналогов (модифицированные культивированные клетки), использование тканевых индукторов, например ростовых факторов, и использование клеток, помещенных в матрикс [Langer et al., 1993].

Тем не менее сам термин «тканевая инженерия» и ее сущность были определены одним из основателей биоинженерии Ян-Чен Фанг в 1985 году. Затем в 1988 году состоялась первая официальная встреча ученых, работающих в этой области. После конференции и последующих успешных симпозиумов начали появляться публикации по этой тематике [Viola et al., 2003]. И только после выхода работ Лангера и Ваканти, термин «тканевая инженерия» стал повсеместно использоваться в научной литературе.

Проблема создания биологических эквивалентов различных тканей появилась вследствие недостаточного количества доноров для трансплантации. Этот недостаток становится все более ощутимым, и многие пациенты умирают, ожидая своей очереди в списках на пересадку необходимого органа. Поэтому *in vitro* создание биологических аналогов органов и тканей стало перспективным направлением развития регенерационной медицины и трансплантологии.

Методы клеточной технологии используют свойства выделенных или модифицированных *ex vivo* (т.е. вне тела пациента) клеток различного происхождения, в результате функционирования кото-

рых происходит улучшение или модификация функции органа или ткани либо ее восстановление или замена утраченной функции [Новик, 2008].

Так, например, давно известны трансплантации клеток (гемопоезических стволовые клетки) и тканей (костный мозг), которые спасли уже не одну сотню жизней.

Помимо клеточных технологий, существенную роль в развитии тканевой инженерии играют разработки новых материалов для создания матриксов, с помощью которых клетки, а также созданные *in vitro* ткани, доставляются в место повреждения. Успехи органической и неорганической, а также физической химии способствовали появлению синтетических материалов, которые обладают преимуществами по сравнению с натуральными, так как при их создании стало возможным задавать матриксам определенные свойства, например такие как размер и форма, и предугадывать их поведение внутри организма.

Современные материалы, используемые для изготовления основы биологических эквивалентов костной ткани

Существует множество клинических случаев, когда лечение костной ткани требует заполнения обширных дефектов. Например, образующихся после удаления опухоли, при ревизионной хирургии вышедших из строя протезов, при восстановлении крупных переломов кости, а также при удлинении конечностей в травматологии и эстетической хирургии. Методы лечения крупных повреждений костной ткани можно разделить на две большие группы - использование аппаратов для чрескожного компрессионно-

дистракционного остеосинтеза и замещение дефектов с помощью натуральных или синтетических имплантов. Несмотря на то что аппараты внешней фиксации чрескожного компрессионно-дистракционного остеосинтеза успешно применяются во многих сложных случаях повреждения костной ткани, они имеют ряд недостатков: необходимость повторных операций для удаления пластин и винтов, нестабильность фиксаторов, сепсис и так далее. Кроме того, метод чрескожного остеосинтеза требует длительного периода восстановления [Cirpar et al, 2006].

Вторым подходом к лечению обширных костных дефектов является применение имплантов различной природы. К натуральным транспланта-там можно отнести кость аутологичной, аллогенной или даже ксеногенной природы, деминерализованный костный матрикс и другие природные материалы. Наряду с этим в последнее время широкое применение получили синтетические импланты костной ткани, созданные с учетом всех необходимых требований к , плотности, прочности и размерам имплантируемого матрикса. Основными преимуществами синтетических материалов, по сравнению с натуральными, являются их легкодоступность, возможность изготовления имплантов необходимого размера и формы, заданной жесткости и скоростью биодеградации.

В зависимости от химического состава все синтетические материалы можно разделить на несколько подгрупп: металлические, полимерные и биокерамика.

Металлические, такие как титан и его сплавы, нержавеющая сталь, в основном используют в ортопедии для изготовления имплантов или средств фиксации - пластин, штифтов, спиц и других. Существуют данные об изготовлении пористых металлических матриксов для замещения крупных костных дефектов [Wen et al., 2005]. Однако они не нашли широкого применения в тканевой инженерии ввиду токсичности и отторжения окружающей тканью [Uo et al., 2001]. Более перспективным направлением для замещения тканей и восстановления их функций является применение пористых биodeградируемых материалов. Синтетические полимеры и биокерамика стали наиболее подходящими материалами для достижения целей тканевой инженерии.

Наиболее перспективными в применении считаются биокерамические материалы. По характеру взаимодействия с тканью их можно разделить на биоинертные и биоактивные.

Инертная биокерамика, как Al_2O_3 , ZrO_2 , нетоксична, неаллергенна и является очень прочным материалом. Однако место контакта инертного материала и костной ткани заполняется волокнистой соединительной тканью. При прочной фиксации зона волокнистой ткани достаточно узкая, но если на границе имплант/ткань возникает некоторая подвижность, то фиброзная капсула может увеличиться до нескольких микрон, что приведет к потере импланта [Hench, 1991]. Кроме того, в результате повышенной прочности импланта из инертных материалов, по сравнению с относительно мягкой костной тканью, наблюдается так называемый положительный и отрицательный «stress-shielding». Данный эффект заключается в том, что нагрузка на костную ткань передается на более прочный имплант, в результате чего окружающая ткань подвергается атрофии [Engh, 1987].

Биостекла, стеклокерамика и биокерамика на основе фосфатов кальция относятся к биоактивным материалам. В 1971 году Хенч показал, что костная ткань крысы связывается химически с поверхностью биостекол определенного состава [Hench et al., 1971]. Биологическую активность этих соединений обеспечивает высокое содержание Na_2O и CaO , так же как и относительно высокий уровень содержания CaO/P_2O_5 [Hench, 1988]. Активность биостекол обуславливается формированием химической связи между поверхностью импланта и окружающей тканью. Считается, что в результате заряда ионов образуются Si-OH группы, затем формируются аморфные кальцийфос-фатные отложения, что приводит к кристаллизации гидроксиапатита и формированию слоя апатита. В слое апатита проис-

ходит адсорбция биологически активных молекул, внеклеточного матрикса, которые способствуют миграции макрофагов и столовых клеток в зону повреждения. Таким образом, на поверхности биоактивного стекла происходит дифференцировка стволовых клеток, образование костного матрикса и его кристаллизация [Valimaki et al., 2006].

Наиболее часто используемым биокерамическим материалом является биокерамика на основе фосфатов кальция. В эту группу входят гидроксиапатит, трикальцийфосфаты и др.

Гидроксиапатит (ГА) является биоактивным материалом, несмотря на отсутствие в его составе кремния. Считается, что во время инкубации биологический кремний может абсорбироваться на щелочной поверхности ГА, аналогично реакции, происходящей на поверхности биоактивного стекла [Hench et al., 1988]. Помимо биоактивных свойств керамических материалов, еще одним преимуществом биокерамики на основе кальцийфосфатов является возможность изменения скорости резорбции материала в процессе изготовления матрикса. Важно, чтобы при формировании костной ткани скорость роста новой кости соотносилась со скоростью биодеградации импланта. Гидроксиапатит является медленно резорбируемым материалом, но, комбинируя его с более растворимыми фосфатами кальция (например, с трехзамещенным ортофосфатом) в различных соотношениях, можно моделировать скорость резорбции нового композитного материала [Mastrogiacomo et al., 2005].

Клеточные технологии, применяемые для создания эквивалентов костной ткани

Работы выдающихся отечественных ученых А.А. Максимова и А.Я. Фриденштейна стали основополагающими в развитии истории изучения стволовых клеток. В 1909 году А.А. Максимов впервые ввел понятие стволовой клетки взрослого организма в целом, а в 70-х годах XX века А.Я. Фриденштейн открыл мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) костного мозга.

ММСК костного мозга являются наиболее удобным материалом для создания биологических эквивалентов костной ткани, поскольку обладают уникальными характеристиками, являются легкодоступными, безвредными и отвечают всем требованиям тканевой инженерии.

Впервые ММСК были выделены из костного мозга по их способности прикрепляться к культуральному пластику [Fridenshtein et al., 1974]. Число этих клеток невелико и составляет всего 0,01-3% всех клеток костного мозга, кроме того, существуют данные, что с возрастом их количество уменьшается [Stolzing et al., 2008]. Однако культивирование *in vitro* выделенных клеток позволяет увеличить их число в сотни раз.

Многочисленные исследования ММСК продемонстрировали, что данные клетки можно получить из разных тканей взрослого организма - кожи [Toma et al., 2001], жировой ткани [Zuk et al., 2002], мышечной ткани и т.д. [Young et al., 1995].

ММСК не обладают специфическим фенотипом и лишены экспрессии индивидуального маркера. ММСК, выделенные из костного мозга, экспрессируют: CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD71, CD73, CD90, CD105, CD166 и HLA ABC [Pittenger et al., 1999; Colter et al., 2001]. В то же время эти клетки не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток: CD34, CD45, CD133, CD33, CD34J; CD 133 и CD45, а также маркер эндотелиальных клеток CD31, как HLA DQ, DR и DP.

Отличительной чертой ММСК костного мозга является способность к цитодифференцировке в различные типы клеток мезенхимных тканей [Pittenger et al., 1999]. Направленная дифференцировка в клетки адипогенной, хондрогенной и остеогенной

линий происходит под воздействием определенных индукторов *in vitro*. В процессе дифференцировки клетки меняют форму и иммунофенотип. Это свойство ММСК костного мозга определило их как перспективный материал для тканевой инженерии разных тканей мезенхимного происхождения.

Из опытов *in vitro* известно, что ММСК в смешанных культурах не лизируются аллогенными Т-клетками и НК-клетками, кроме того, они оказывают супрессивный эффект на функциональную активность Т-лимфоцитов [Krampera et al., 2003; Le Blanc et al., 2003]. Таким образом, иммунологические свойства ММСК костного мозга позволяют использовать их даже в качестве аллогенного материала при создании биологических эквивалентов тканей и органов.

В последние годы учеными всего мира всесторонне изучались потенции стволовых клеток к репарации различных тканей на предмет их использования в регенерационной медицине. Разрабатываются технологии, позволяющие использовать выделенные и размноженные в условиях *in vitro* ММСК в медицине для восстановления поврежденных тканей и органов.

Сегодня совершенно очевидно, что наибольших результатов с использованием ММСК можно добиться в ортопедии при лечении костно-хрящевых и костных дефектов.

Были получены положительные результаты при трансплантации ММСК детям, страдающим от несовершенного остеогенеза (*osteo imperfecta*) [Honvitz et al., 2002]. Но для заживления обширных костных повреждений требуется направленное введение клеток в область дефекта. С этой целью стали использовать матриксы из различных материалов.

Гошима первый в экспериментах на мышах показал формирование новой кости внутри пористого биокерамического матрикса, заполненного ММСК [Goshima et al., 1991]. С этого момента началось стремительное развитие данного направления тканевой инженерии. Изучались различные виды матриксов и влияние материалов, из которых они изготовлены, на жизнеспособность заселенных ММСК, проводились многочисленные исследования по отработке методики культивирования и равномерного заселения матриксов клетками. Все эти исследования проводились на разных животных, начиная от лабораторных бестимусных мышей и заканчивая сельскохозяйственными животными, которые на данный момент считаются наиболее подходящими моделями для изучения репаративного остеосинтеза. В основном на баранах отработывались различные методики формирования костного дефекта и способы фиксации тканевого имплантата.

Заключение

В настоящее время методы клеточной биологии приобрели приоритетное развитие в клинической медицине. С помощью этих методов стало возможным получать клетки со специализированными свойствами, которые могут быть использованы для улучшения или восстановления функций тканей или органов. Клеточные технологии, наряду с успехами физико-химических наук, составили основу для развития тканевой инженерии. Появление новых материалов и их сочетание с уникальными свойствами выделенных или модифицированных *in vitro* клеток позволило сделать определенные прорывы в области регенерационной медицины и трансплантологии.

К своему 125-летию (2005 год) американский научный журнал Science опубликовал список из 125 величайших загадок, которые предстоит решить современной науке. Вопрос о стволовых клетках, регенерации и выращивании органов и тканей находится на восьмом месте. За последние пять лет исследователи сделали множество открытий, касающихся клинического применения клеточных технологий и тканевой инженерии. Так,

сейчас ученые уже применяют искусственно выращенную кожу, трахеи, с помощью костных трансплантатов предпринимаются попытки лечения костных переломов и т.д. На сегодняшний день многие исследования в области применения клеточных технологий в медицине проходят вторые стадии клинических испытаний, что вселяет надежду на их повсеместное применение в регенерационной медицине и трансплантологии.

1. *Cirpar M., Cetik O., Uslu M., Eksioglu F.* Common complications of segmental bone transport with Ilizarov technique in defective tibia pseudoarthrosis: a review. *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology*. 2006; 16(4): 380-385.
2. *Colter IXC., Sekiya J., Prockop D.J.* Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(14): 7841-5.
3. *Engh C.A., Bobyn J.D., Glassman A.H.* Porous-coated hip replacement. The factors governing bone ingrowth, stress shielding and clinical results. *J Bone Joint Surg Br*. 1987; 69(1): 45-55.
4. *Fridenshtein A.J., Deriglazova U.F., Kulagina N.N. et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol*. 1974; 2: 83-92.
5. *Goshima J., Goldberg V.M., Caplan A.I.* The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res*. 1991; (262): 298-311.
6. *Hench L.L.* Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 1991;74(7): 1487-510.
7. *Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C. et.al.* Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 1971; 2: 117-141.
8. *Hench L.L.* Bioactive ceramics. *Ann N Y Acad Sci*. 1988; 523:54-71.
9. *Honvitz E.M., Cordon P L., Koo W.K. et.al.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2002; 99(13). 8932-8937
10. *Krampera M., Glennie S., Dyson J., et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003; 101(9): 3722-9
11. *Langer R., Vacanti J.P.* Tissue Engineering. *Science*. 1993; 260: 920-926.
12. *Lazzeri D., Gatti G.L., Romeo G., Bahnelli B., Massei A.* Bone- regeneration and perineoplasty: a 250-year-long history. *Cleft Palate Craniofac J*. 2009; 46(6): 621-628.
13. *Le Blanc K., Tanunik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringden O.* HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Hep Hematol*. 2003; 31(10)- 890-6
14. *Mastrogiacomo M., Muraglia A., Komlev V. et.al.* Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res*. 2005; 8(4): 277-84.
15. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et.al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999- 284(5411)- 143-7
16. *Stolzing A., Jones E., McGonagle D. et al.* Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*. 2008; 129(3)- 163-73
17. *Toma J.G., Alduwaini M., Fernandes K.J. et.al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001; 3(9): 778-84.
18. *Ueda M., Watari F., Yokoyama A., Matsuno H., Kawasaki T.* Tissue reaction around metal implants observed by X-ray scanning analytical microscopy. *Biomaterials*. 2001; 22(7): 677-85
19. *Vdliniuk V.-V., Aro H.T.* Molecular Basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scandinavian Journal of Surgery*. 2006;
20. *Viola J., B. Lal, O.* Grad The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field. *Abt Associates Inc*. 2003.
21. *Wen C., Yamada Y., Hodgson P.* Fabrication of novel metal alloy foams for biomedical applications. *Materials forum*. 2005; 29: 274-278.
22. *Young H.E., Mancini M.L., Wright R.P. et.al.* Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn*. 1995. 202(2): 137-44.
23. *Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et.al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13(12): 4274-95.
24. *Новик А.А., Иванов Р.А.* Клеточная терапия. МИЛ. Под редакцией Ю.Л. Шевченко. 2008.