

ОБЗОРЫ

ВОЗМОЖНОСТИ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В РЕГЕНЕРАЦИИ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

В.А. Мицкевич

ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

1. Регенерация хряща в норме и при патологических состояниях

Основными элементами хряща являются хондроциты и межклеточный матрикс. Хондроциты составляют 1% объема хряща, они продуцируют матрикс, который состоит из коллагена II типа. Матрикс обеспечивает форму суставного хряща, а также обмен веществ в хряще. Хондроцит, который продуцирует матрикс, постепенно оказывается заключенным в лауну из матрикса, где продолжается процесс деления клетки, в результате чего лагуна заполняется клоном хондроцитов [14]. В хрящевой ткани процессы отмирания клеток и их репродукции являются постоянными. Физиологическая регенерация хряща идет из молодых остеохондрогенных стромальных клеток, которые могут дифференцироваться как в хондроциты, так и в остеобласты. Путь дифференцировки клеток зависит от их микроокружения таким образом, что при обильной оксигенации ткани образуется кость, а при недостатке кислорода – хрящ [14]. По мнению Т.П. Виноградовой [2], недифференцированные клетки дифференцируются в хрящевые, что обеспечивает оппозиционный рост хряща. Согласно современным представлениям, структура хряща образуется в результате постепенного и непрерывного физиологического продвижения и постального созревания хрящевых клеток в направлении от поверхности хряща к его глубоким слоям. В поверхностных и переходных зонах хряща имеются молодые клетки, которые составляют клеточный резерв. Погружение и продвижение незрелых клеток служит источником хондрогенеза при физиологической и репаративной регенерации хряща [8].

Хрящ относится к ткани с относительно низкими возможностями для регенерации. Для восстановления суставного хряща необходимо наличие следующих составляющих: 1) популяции клеток, способных к дифференцировке в хондроциты в месте дефекта, 2) межклеточный матрикс, в который внедряются хрящевые клетки, 3) конгруентные суставные концы, 4) нормальная внутрисуставная среда, 5) нормальные движения в суставе и дозированная механическая нагрузка [5, 22]. Роль движения заключается в том, что, во-первых, оно стимулирует восстановление хрящевой ткани, а, во-вторых, поддерживает поступление новой порции суставной синовиальной жидкости, которая необходима для питания хряща [51]. По мнению Г.И. Лавришевой, Г.А. Оноприенко [5] для регенерации суставного хряща необходима нормальная биомеханика сустава, т.е. движение суставных поверхностей и наличие суставной щели, что достигается в ортопедии благодаря применению аппаратов наружной фиксации конструкции Илизарова, Волкова-Оганесяна и др. [3, 4].

Травма хряща

В ответ на травму сустава наблюдается специфическая реакция хондроцитов, в которой выделяются три компо-

нента: 1) усиление пролиферации, 2) усиление продукции матрикса, 3) уменьшение разрушения матрикса [31]. При травме хряща имеется два источника пролиферации клеток и синтеза матрикса: 1) клетки внутренней поверхности дефекта хряща, 2) клетки периферических отделов сустава и клетки субхондральной кости [57].

На развитие хрящевого дефекта влияют размер и глубина повреждения. Дефект размером до 2 кв. см может не давать клинической симптоматики и не прогрессировать, т.к. поверхность дефекта непосредственно не контактирует с суставной поверхностью другого сегмента. В отличие от небольшого повреждения, дефект размером более 2 кв. см дает клиническую симптоматику. Большой дефект вступает в контакт с суставной поверхностью другого сегмента. Хрящ, окружающий место повреждения, обладает низкой способностью к регенерации, а сам дефект способен к увеличению. Зависимость развития дефекта хряща от его глубины заключается в том, что полное повреждение хряща до субхондральной кости замещается волокнистым хрящом, который состоит из коллагена I типа и имеет низкую механическую прочность. Частичное повреждение хряща не на всю глубину может не прогрессировать в связи с отсутствием механизма запуска регенерации. Травма хряща вызывает появление в синовиальной жидкости сустава цитокинов и фермента стромелизина, которые способны привести к дегенерации хряща и развитию посттравматического артроза [40].

Остеоартроз

Остеоартроз (ОА) может развиваться либо как самостоятельное первичное заболевание, либо как результат травмы сустава. Для развития ОА имеет значение взаимосвязь между возрастным и механическим факторами риска. Первичный идиопатический ОА одного сустава встречается у 5% людей моложе 25 лет и у 80% людей старше 75 лет. Рентгенологические признаки ОА средней и тяжелой степени встречаются у лиц моложе 45 лет менее чем в 5% случаев и более чем в 45% случаев у лиц старше 75 лет [42]. К механическим факторам риска ОА относятся большие осевые и торсионные нагрузки, нарушение конгруентности суставных поверхностей, нестабильность сустава, а также мышечный дисбаланс [22]. При ОА в хрящевой ткани происходит деполимеризация протеогликанов (ПГ), разволокнение и набухание коллагеновых волокон, что способствует их дальнейшей деградации. Наступает отек и снижение эластичности хряща, а затем нарушение целостности его поверхности. При наличии благоприятных условий на фоне гипергидратации хряща могут начаться компенсаторные процессы в виде ускорения размножения хондроцитов и увеличения синтеза [7]. При неблагоприятных условиях происходит нарушение баланса между содержанием ферментов и их ингибиторов, что, на фоне угнетения синтеза компонентов матрикса хряща, усиливает его деграцию. При артрозе на поверхности синовиальной оболочки обнаруживаются хрящевые вкрапления, а в полости сустава – свободные хрящевые фрагменты. Поверхность суставного хряща теряет присущие ей блеск и эластичность. По мере усиления степени дегенерации хряща усиливается выра-

женность прогрессирования процесса [42]. На поздних стадиях артроза поражается субхондральная кость. В далеко зашедших стадиях происходит изменение со стороны костной ткани в виде склероза субхондральных отделов, разрастания остеофитов, образования субхондральных кист и т.д.

Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит (РА) относится к аутоиммунным заболеваниям. В настоящее время РА рассматривается как патология гемопоэтических стволовых клеток (СК) [58]. Для РА характерны выраженные изменения в суставах. В начале процесса в синовиальную оболочку сустава пролиферируют синовиоциты и фибробласты, которые продуцируют провоспалительные цитокины, в частности интерлейкин-1. Цитокины приводят к активации металлопротеиназ и снижению количества их ингибиторов. Действие протеиназ приводит к разрушению суставного хряща [44]. Имеющиеся в синовиальной жидкости трансформирующий фактор роста бета и костный морфогенный протеин оказываются не в состоянии подавить активность провоспалительных цитокинов [32]. В хрящевой ткани происходит нарушение питания хондроцитов с истончением и эрозией хрящевого покрова сустава. Матрикс хряща подвергается инвазии со стороны гистиоцитов. Идет постепенное прорастание сосудов, что приводит к развитию васкулита. Самым характерным проявлением РА является рост паннуса. Это грануляционная ткань, растущая со стороны краев синовиальной оболочки и со стороны субхондральной кости. Поверхностные слои паннуса состоят из фагоцитирующих А-клеток и фибробластических В-синовиоцитов. В глубоких слоях паннуса находятся сосуды и активные мононуклеарные фагоциты, лимфоциты Т и В, плазмоциты и фибробласты. Эти клетки врастают в хрящ вместе с сосудами. Наиболее выраженные изменения происходят на границе суставного хряща и паннуса. По мере развития процесса хрящевая поверхность сустава становится сухой, зернистой и приобретает желтый цвет. Поврежденные суставные поверхности покрываются фиброзной тканью. Фиброз приводит к сближению суставных концов, в результате чего происходит сужение суставной щели. В далеко зашедших случаях образуется контрактура или фиброзный анкилоз сустава.

Как видно из приведенных данных, как при травме, так и при системных заболеваниях соединительной ткани имеет место комплекс изменений, в результате чего происходит разрушение суставного хряща. Эти изменения достаточно многообразны, а восстановление хряща является легко уязвимым процессом.

II. Материалы и средства тканевой инженерии

В настоящее время изучение проблемы регенерации концентрируется в рамках науки, которая получила название тканевой инженерии. Целью тканевой инженерии является создание биологических заменителей ткани, которые могут быть имплантированы или трансплантированы в организм для восстановления либо замещения пораженной ткани или больного органа. Тканевая инженерия опорно-двигательной системы, направленная на создание биологических заменителей костной и хрящевой ткани, рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений в науке о человеке [22, 25, 38, 45, 55]. Биологические заменители тканей любого вида представляют собой композиции из живых клеток и межклеточного вещества. Для создания хрящевой ткани необходимо соединение межклеточного матрикса с культурой хондроцитов и факторами роста клеток [25].

Межклеточный матрикс

Межклеточный матрикс представляет собой полимер, который обладает трехмерной структурой. Матрикс обеспе-

чивает организацию и удержание клеток, а также создает условия для их роста. Матрикс должен иметь достаточную прочность для того, чтобы выдерживать давление сочленяющихся суставных поверхностей. Чаще всего матрикс формируется из коллагена или гиалуроната [49]. Матрикс насыщается либо изолированными клетками, либо цельным костным мозгом, объем которого должен находиться в определенном соотношении с объемом матрикса. Коллагеновые волокна могут покрываться фибронектином. [54]. На животных испытан препарат, в котором в качестве матрикса используется коллагеновый гель, в который помещена взвесь аутохондроцитов. Введенные в сустав, эти клетки полностью прижились через год после операции [46]. В настоящее время апробирована структура матрикса, которая позволяет повысить его прочностные свойства [27, 34], создан трехмерный матрикс, содержащий костный морфогенный протеин, что обеспечивает оптимальные условия роста и дифференцировки клеток [15], а также разработан биодеградирующий матрикс, который выполняет временную функцию [57].

Факторы роста

Факторы роста оказывают стимулирующее действие на репаративную регенерацию практически всех тканей. В качестве факторов роста хряща был применен ряд средств.

Костный морфогенетический белок (КМБ) принимает участие в метаболизме хряща и стимулирует его регенерацию, обеспечивает дифференцировку хрящевых клеток и созревание матрикса [23]. КМБ-2 индуцирует синтез матрикса хондроцитами и способствует росту хряща. Внутрисуставное введение КМБ-2 в эксперименте привело к увеличению синтеза ПГ в 3 раза [62]. КМБ стимулирует восстановление кости и гиалинового хряща при остеохондральных дефектах [9]. В эксперименте коллагеновая губка, пропитанная КМБ, помещенная в дефект хряща, привела к регенерации хряща в 6 месячный срок. КМБ защищает хрящ от разрушения, способствует восстановлению синтеза ПГ хондроцитами, который нарушается под действием интерлейкина-1 [37].

Трансформирующий фактор роста (ТФР)-бета по ряду направлений действует совместно с КМБ. Его наибольшая концентрация определяется в костном матриксе, где он стимулирует пролиферацию клеток соединительной ткани при повреждении кости [9]. ТФР -бета регулирует морфогенез в эмбриональном периоде, стимулирует синтез коллагена II типа и синтез ПГ хондроцитами [62]. Обработка культуры клеток синовиальной оболочки ТФР-бета приводит к образованию хрящевой ткани [24, 58], тогда как постоянная стимуляция синтеза ПГ с помощью ТФР и КМБ может приводить к оксификации хряща [32].

Инсулиноподобный фактор роста (ИФР) играет ключевую роль в регуляции обмена ПГ в хондроцитах. Разная степень его действия связана с гетерогенностью хондроцитов в разных участках суставного хряща [63]. А. Ralger с соавт. [50] установили, что действие ИФР на рост и развитие хрящевой ткани сильнее всего выражено в эмбриональном периоде.

В качестве стимуляторов роста хряща в разное время с разным успехом были использованы ИЛ-4 [18, 33], полигликолевая кислота, активин-А, фактор роста хондроцитов, ретиноевая кислота [52], ядерный фактор активирования Т-клеток, фактор роста фибробластов [50], хрящевой морфогенетический белок [15].

Гормон роста человека способствует повышению пролиферативных свойств хондроцитов [17]. Было установлено, что пролиферации хондроцитов способствуют также инсулин, эпидермальный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста, а также непосредственно ПГ [31]. Человеческий рекомбинантный фактор роста фибробластов обеспечивает *in vivo* дифференцировку хондроцитов и синтез матрикса, в связи с чем его можно использовать в клинике для регенерации хряща [58].

Был сделан ряд предложений по методике применения факторов роста, которые могут либо входить в состав культуральной среды, либо вводиться непосредственно в сустав вместе с другими ингредиентами [57]. По мнению J. Buckwalter, H. Mankin [22] наиболее перспективным методом для репарации хряща является приготовление *in vitro* комплекса в виде матрикса, культуры хрящевых клеток и факторов роста, после чего эта смесь имплантируется в сустав.

Культура клеток

С точки зрения тканевой инженерии имплантируемые клетки должны отвечать следующим требованиям: простота получения, способность к быстрому культивированию и размножению в культуре в достаточном количестве [37]. Для культивирования ткани используются как недифференцированные, так и зрелые дифференцированные клетки. К недифференцированным клеткам относятся СК. СК - это класс долгоживущих клеток, у которых имеется способность к устойчивому самовоспроизведению, пролиферации и генерации, при этом они дифференцируются в разных направлениях в зависимости от обстоятельств. Существуют разные классификации СК. СК делятся либо на эмбриональные и соматические [6], либо на эмбриональные, фетальные и взрослые [57].

Эмбриональные стволовые клетки

Эмбриональные СК имеются у зародыша. В течение первых 2 - 4 суток после оплодотворения яйцеклетки в результате ее дробления образуются эмбриональные СК, которые обладают свойством тотипотентности. Это означает, что клетка способна генерировать все клетки и ткани эмбриона, а также развиваться до взрослого организма. По мере развития зародыша происходит снижение потенциальности клеток. К 5 - 7 дню развития эмбрион находится на стадии бластоцисты. Его размер составляет 1/7 мм. В нем содержится 250 клеток, из них 30 - 40 клеток составляют внутреннюю клеточную массу. Эти клетки являются плюрипотентными, т.е. из них образуются все ткани организма, но весь организм сформироваться не может. Свойство плюрипотентности сохраняется до тех пор, пока эмбрион не имплантируется в стенку матки, что происходит на 7 день его развития. После этого зародыш превращается в плод.

Из внутренней клеточной массы образуются три зародышевых листка. Из среднего зародышевого листка - мезодермы - образуется соединительная ткань, которая дает начало развитию кости и хрящу. В ней содержатся недифференцированные плюрипотентные клетки, которые В.И. Стецула [11] определял как скелетобласты, составляющие основу антенатального гистогенеза. Эти клетки формируют органы опоры. В определенных условиях они могут дифференцироваться в более специализированные клетки. Тип новообразованной клетки определяется интенсивностью ее роста. При интенсивном росте скелетобласты дифференцируются в прехондробласты и хондробласты, а при медленном росте - в остеобласты и хондроциты. Хондробласт представляет собой клетку в переходной стадии от прехондрогенной, т.е. идущей по пути хондрогенного развития до зрелого хондроцита [5]. Фенотип клетки поддерживается действием микроокружения, которое создается полноценным хрящевым матриксом.

К важнейшим свойствам эмбриональных СК относится их большая потенциальность. Клетки могут давать 300 - 400 циклов удвоения. При обеспечении необходимых условий они могут дифференцироваться в разные ткани.

Применение эмбриональных СК в клинической практике задерживается в связи с существованием ряда нерешенных вопросов:

1) Неясность путей дифференцировки пересаженных эмбриональных СК, а также отсутствие контроля за дифференцировкой клеток. Предполагается, что эмбриональные СК могут дифференцироваться в стромальные СК, а те, в свою очередь, - дифференцироваться в хондроциты [57]. В

настоящее время остается малоизученным вопрос, можно ли пересаживать изолированные эмбриональные СК или они должны имплантироваться вместе с другими тканями, которые индуцируют и стимулируют процесс их дифференцировки.

2) Тканевая несовместимость. Пересаживаемые эмбриональные СК представляют собой аллогенный материал, который вызывает реакцию отторжения. Для того, чтобы избежать реакции трансплантата, может возникнуть необходимость в назначении реципиенту иммунодепрессантов, либо в обработке трансплантата методами генной инженерии.

3) Этика получения эмбрионального материала. Получение эмбриональных СК связано с необходимостью прекращения развития эмбриона внутри организма матери. В настоящее время для того, чтобы избежать ущерба для здоровья матери и плода, разработаны следующие методы получения эмбриональных СК. Во-первых, искусственное оплодотворение с выращиванием зародыша *ex vivo* на протяжении 5 - 7 дней в среде, содержащей факторы роста. Во-вторых, генный трансфер или перенос ядра соматической клетки донора в яйцеклетку, у которой предварительно удалено собственное ядро, с последующим выращиванием клеток на интактных средах.

4) Остается подозрение о возможности опухолевого перерождения эмбриональных клеток [57].

Отсутствие ответа на вышеприведенные вопросы не позволяет применять эмбриональные СК в клинике с целью замещения дефектов тканей сустава в настоящее время.

Соматические стволовые клетки

Соматические СК имеются во взрослом организме. По сравнению с эмбрионом, число СК у взрослого относительно меньше. На 10 тыс. клеток костного мозга встречается 1 СК [57]. По данным P. Zuk с соавт. [66] на 1 СК приходится 10 млн. других стромальных клеток. Соматические СК представляют собой недифференцированные клетки, находящиеся в составе дифференцированной ткани. Они обеспечивают постоянную смену клеток при их физиологической смерти и повреждении [1]. В отличие от плюрипотентных клеток эмбриона, СК взрослого имеют меньшую степень потенциальности. Они определяются как мультипотентные, т.е. способные к развитию только в одном, определенном направлении, в результате чего получают клетки генетически завершенного типа. У взрослого СК обнаруживаются в костном мозге, крови, сетчатке глаза, роговице, пульпе зуба, печени, коже, поджелудочной железе. При беременности СК появляются в пуповинной крови. СК, которые содержатся в костном мозге, подразделяются на гемопозитические и стромальные. Последние могут дифференцироваться в адипоциты, хондроциты, миоциты и остеобласты. Трансформация СК в зрелые клетки определяется действием локальных факторов, которые специфичны только для данной ткани [1]. Пути дифференцировки стромальных клеток из костного мозга остаются неясными [32]. S. Gilloglu с соавт. [25] считали, что результатом дифференцировки СК является образование хрящеподобных клеток. Показано, что стромальные СК могут превращаться как в хрящевые, так и в костные клетки [57].

В клинике стромальные клетки чаще всего получают путем пункции костного мозга. В результате последующего культивирования в монослойной культуре число СК может быть увеличено в 2000 раз в течение 10 дней [32, 55]. Из СК могут быть культивированы стромальные фибробласты, клонирование которых впервые было разработано Р.К. Чайлахяном [12]. Это типичные фибробласты, которые являются предшественниками стромальных механицитов. Они синтезируют коллаген и имеют невысокую активность щелочной фосфатазы. Формирование колоний фибробластов начинается через 3 - 4 дня после забора костного мозга, а к 10 дню колонии могут состоять из нескольких тысяч клеток. Рост фибробластов происходит только при достаточной плотности клеточного слоя. В монослойной культу-

ре фибробласты легко пассируются и сохраняют диплоидное число хромосом до 20 и более пассажей [13]. Кроме костного мозга, источником стромальных СК могут быть другие ткани. В настоящее время разработана методика выделения фибробластоподобных клеток из гетерогенной популяции СК, имеющихся в жировой ткани, которую получают методом липосации из подкожной жировой клетчатки [66].

Применение соматических СК имеет следующие положительные стороны:

1) Они детерминированы на развитие по определенному пути для создания именно данной ткани, т.е. могут дать полноценное замещение утраченной ткани или органа.

2) Некоторые СК обладают способностью к миграции к месту дефекта ткани. Это дает свободу при выборе места трансплантации, т.к. они сами оказываются в нужном месте.

3) Ряд соматических СК продуцирует факторы роста, которые стимулируют дифференцировку клеток, что повышает эффективность трансплантации. Выработка факторов роста может быть увеличена с помощью методов генной инженерии [57].

По сравнению с эмбриональными СК применение собственных соматических СК для ликвидации тканевого дефекта имеет следующие преимущества: 1) отсутствие затруднений этического характера, 2) отсутствие тканевой несовместимости.

Зрелые дифференцированные клетки

К зрелым клеткам относятся хондроциты. В отличие от эмбриональных СК и соматических СК, это более дифференцированные клетки. Хондроциты сохраняют способность к размножению, что используется с целью их выращивания на культуре *in vitro*. При культивировании в монослойной культуре происходит изменение дифференцировки хондроцитов, а их фенотип оказывается нестабильным. Для того чтобы избавиться от нестабильности, культивирование клеток можно производить в трехмерной агаровой культуре. В результате формируются типичные хондроциты, которые способны продуцировать кластеры. Эти хондроциты обладают всеми признаками морфологической дифференцировки, т.е. имеют округлую форму, располагаются внутри лакун и продуцируют коллаген II типа.

Функциональное состояние хондроцитов оценивается по способности к пролиферации и синтезу коллагена [17]. Выработка хондроцитом коллагена зависит от условий, в которых он находится. Один и тот же хондроцит способен к синтезу коллагена разного типа. Находясь в нормальном суставе, хондроцит продуцирует коллаген II типа. Находясь вне сустава в монослойной культуре, он продуцирует коллаген I типа. Будучи помещенным в дефект суставного хряща, он снова оказывается способным к синтезу коллагена II типа, т.е. процесс синтеза коллагена определенного типа оказывается обратимым. По мнению L. Varone [16] хондроциты взрослого человека, помещенные в дефект хряща, не способны превращаться в костные клетки.

III. Замещение дефектов хряща при различных патологических состояниях в эксперименте и клинике

Травма хряща

Для восстановления дефекта хряща при его травматическом повреждении с помощью тканевой инженерии используются как зрелые хондроциты, так и стромальные СК костного мозга. Практическое использование костного мозга как стимулятора хондрогенеза началось гораздо раньше, чем в его составе были обнаружены стромальные СК (Magnusson, 1946, Smith-Peterson, 1948, цит. по B. Mandelbaum с соавт) [40]. После выделения и изучения СК стало понятно, что именно они обеспечивают стимулирую-

щее воздействие костного мозга на хондрогенез. Методика применения костного мозга заключается в том, что у больного с повреждением хряща во время операции на суставе производятся такие манипуляции, как абразивная артропластика, туннелизация кости, создание микропереломов субхондрального слоя кости, а также множественные перфорации области дефекта хряща [41]. Эти процедуры приводят к кровотечению из губчатой кости и образованию над дефектом хряща кровяного сгустка. В нем содержатся СК и факторы роста, которые служат необходимым компонентом для образования новой ткани. В результате дифференцировки СК и их роста поверхность дефекта постепенно закрывается хрящом, как считают практически все специалисты, применяющие эти методы. Имеются публикации о большом количестве подобных вмешательств и об их положительном исходе. При гистологическом исследовании новообразованного суставного хряща было установлено, что он является волокнистым. Он отличается от гиалинового хряща, который свойственен нормальному суставу, по целому ряду характеристик. Прочность волокнистого хряща ниже, чем у гиалинового, почти в 3 раза [39]. Волокнистый хрящ недостаточно интегрирует в хрящевое покрытие сустава реципиента. Он способен закрывать только небольшие дефекты суставной поверхности, а большие дефекты закрываются не полностью [32, 64]. В результате создание такого хрящевого покрытия стало рассматриваться как малоэффективное хирургическое мероприятие [41, 42].

Определенным этапом в проблеме замещения дефектов хряща была пересадка надхрящницы и надкостницы. Наличие в составе этих тканей недифференцированных клеток позволяло предположить, что они могут быть использованы для стимуляции роста хряща и кости [47]. По мере накопления опыта оказалось, что эта процедура не оправдала возложенных на нее надежд. Пересадка перихондрального трансплантата реберного хряща через 8 лет после операции привела к ухудшению состояния суставной поверхности у 60% больных. Через 8 лет после закрытия хрящевого дефекта надкостницей у 75% больных были отмечены неудовлетворительные результаты, а у 50% больных наблюдалось прогрессирование ОА [41, 42]. Оссификация хряща после закрытия дефекта ткани с помощью надкостницы наступала через 3-5 лет, что, по мнению S.O'Driscoll с соавт. [47], связано с продуцированием клетками надкостницы коллагена I типа.

Костно-хрящевые трансплантации в небольшие дефекты хряща дали хорошие результаты только у незначительного числа больных. При комбинированном применении реберного хряща и надкостницы случаев образования гиалинового хряща отмечено не было [22]. Аутогенная трансплантация костно-хрящевого фрагмента имеет отрицательную сторону в виде нанесения дополнительной травмы в месте забора трансплантата [57]. По мнению V. Bobic [19], отдаленные результаты этого метода лечения чаще всего оказывались неизвестными. Для того, чтобы вмешательство оказалось эффективным, необходимо учитывать такие особенности состояния, как величина и глубина дефекта хряща, способность клеток трансплантата к росту, а также промежуток между трансплантатом и тканью реципиента. При этом отдельной проблемой является сложность получения качественной фиксации как ауто, так и аллотрансплантата на новом месте [40].

С середины 80-х годов начались эксперименты по закрытию дефекта хряща комплексом тканей в виде надкостницы вместе с культурой хондроцитов. Через полгода после трансплантации хондроциты из культуры дифференцировались и синтезировали коллаген II типа, в результате чего образовался гиалиновый хрящ [26]. Новообразованный гиалиновый или гиалиноподобный [25] хрящ по механическим свойствам превосходил фиброзный хрящ.

Методику пересадки хондроцитов с надкостницей впервые в клинике применил M. Brittberg в 1987 г [20]. Препарат из хондроцитов получил название картицел. Методика применения заключается в том, что во время артроскопии

берется биопсия хряща из ненагружаемого участка сустава. Из хрящевой ткани, после ее обработки ферментами, выделяются хондроциты, которые помещают в монослойную культуру. Хондроциты пролиферируют и синтезируют в культуре коллаген I типа. Этот процесс носит обратимый характер, т.е. эти же клетки, помещенные в дефект хряща, начинают синтезировать коллаген II типа. Процедура культивирования клеток продолжается не менее 3 недель. За это время число хондроцитов увеличивается в 10 – 12 раз и составляет 12 млн. клеток. Для пересадки хондроцитов необходимо произвести повторную операцию, во время которой делают два разреза. Из первого по передней поверхности голени берется участок надкостницы большеберцовой кости. Вторым разрезом является артротомия, во время которой дефект суставного хряща покрывается удаленной надкостницей, которая пришивается и приклеивается к хрящу. После фиксации под надкостницу вводится 0,2 – 0,3 см³ взвеси хондроцитов [20, 40]. Для облегчения трансплантации хондроциты выращиваются на мембране из полимерного матрикса. Такой мембранно-клеточный комплекс целиком закрывает дефект хряща и предохраняет клетки от механического повреждения [49]. Для лечения больных с помощью картицелла были выработаны показания с учетом размера дефекта хряща и запросами пациента. У больного с дефектом до 2 см² и низкой физической активностью трансплантация аутохондроцитов является вторым этапом лечения, после того как первым этапом осуществляется дебридмент сустава или туннелизация, которая дает эффект на 3-5 лет. У больного с дефектом более 2 см² и высокой физической активностью пересадка собственных хондроцитов делается в виде первого этапа лечения с 90% успехом [40]. Применение картицелла оказалось эффективным при соблюдении следующих требований: дефект хряща расположен на мышелках бедренной кости, он носит локальный характер и распространяется на всю глубину хрящевого слоя; сустав стабилен, биомеханика сустава нормальная, амплитуда движений в суставе сохранена, надколенник находится в правильном положении. Противопоказанием к пересадке является острый воспалительный процесс, тяжелый ОА. Реабилитация после операции пересадки аутохондроцитов является длительным процессом, а ограничение нагрузки на сустав рекомендуется в течение 3 месяцев [25]. Восстановление хряща после применения картицелла может быть объяснено действием следующих механизмов: 1) пересаженные хондроциты продуцируют новый матрикс, 2) образование новых хондроцитов стимулируется надкостницей, 3) надкостница и пересаженные клетки оказывают стимулирующее действие на хондроциты окружающих тканей, которые, в свою очередь, продуцируют новый матрикс [20, 21].

В настоящее время имеются сообщения о применении этого метода более чем у 2000 больных. Срок наблюдения колеблется от 6 до 10 лет. В среднем, у 80% больных через 8 лет после операции отмечается улучшение состояния [20, 21, 41, 42].

Ревматоидный артрит

Восстановление суставного хряща при РА рассматривается как часть общего лечения этого заболевания, т.к. патологический процесс носит системный характер и поражает большое число тканей и органов [28]. Ликвидация системного процесса методами тканевой инженерии осуществляется путем комбинации локального воздействия на сустав и общего воздействия на организм. Эти методы были отработаны в опытах на животных. Экспериментальной моделью РА являются мыши MRL, у которых артрит является генетически детерминированным заболеванием и проявляется так же, как РА у человека [30]. С целью общего воздействия на большое животное осуществляется либо трансплантация гемопоэтических клеток и кости от взрослого здорового животного, либо трансплантация здоровых фетальных тканей – печени, кости и тимуса, в которых со-

держатся мультипотентные гемопоэтические и СК [28, 30]. Одновременно, с целью местного воздействия на сустав, применялась культура СК [32]. Эксперименты показали эффективность комбинированной терапии в виде увеличения продолжительности жизни больных животных [28].

В эксперименте также была осуществлена генная трансформация тучных клеток, в результате чего они перестали продуцировать провоспалительный цитокин ИЛ-4. Пересаженные клетки подавляли артрит и резорбцию костной ткани у экспериментальных животных. Однако, по мнению S. Kim с соавт. [36], перенесение этой методики в клинику затруднено в связи со сложностью выделения дендритных клеток у человека. Для восстановления сустава при РА было предложено наносить на дефект хряща культуру СК, обработанных трипсином [23, 57].

В настоящее время восстановление хряща при РА встречает ряд трудностей: 1) аутотрансплантация цельного костного мозга оказывается малоэффективной в связи с незначительным числом стромальных СК в пунктате костного мозга [32], 2) собственные СК оказываются пораженными системным аутоиммунным процессом. Их число в костном мозге незначительно, а их культивирование осуществляется с трудом [57, 58]. Для улучшения интеграции СК в ткани реципиента были применены такие средства, как рецепторы ФНО, ИЛ-13, костный морфогенный белок и инселиноподобный фактор роста. Однако результаты экспериментов оказались неопределенными [32], 3) при РА собственные хондроциты обладают низкими функциональными возможностями в связи с нарушением процесса их дифференцировки. Около 3% клеток находится в состоянии апоптоза [35]. При РА время удвоения числа СК больше, чем для здоровых клеток. Так, в течение 1 нед число хондроцитов здорового человека увеличивается в 7 раз, а для больных РА оно возрастает только в 2 раза [49].

При РА свежие изолированные хондроциты образуют небольшие кластеры с относительно большим числом клеток. Они обладают низкой адгезией и рано погибают. Для улучшения соединения клеток поверхность пластин, на которых культивируются клетки, покрывается веществами, содержащими молекулы адгезии. Это приводит к улучшению роста клеток. При наличии неблагоприятных условий дифференцировки хондроциты приобретают необычную веретенообразную форму. Для восстановления формы клеток производится увеличение числа пассажей, после чего хондроциты, полученные от больного РА, приближаются по своим свойствам к клеткам здорового человека [49].

Дефект собственных тканей при РА может сделать аутотрансплантацию клеток неэффективной. В таком случае аллотрансплантация выглядит как метод выбора, который имеет как отрицательные, так и положительные стороны. К отрицательным относится тканевая несовместимость. К положительным – то, что при РА отсутствует острая необходимость в пересадке, т.к. аутоиммунное заболевание является хроническим процессом. При длительно текущем заболевании в распоряжении врача имеется большой резерв времени для подбора донора клеток [57].

В клинике пересадка цельного хряща или его клеток при РА производилась относительно редко. Опыт пересадки хряща при системных процессах был накоплен в стоматологии. Трансплантация собственного реберного хряща у больных ЮРА с поражением височно-нижнечелюстного сустава оказалась успешной в срок через 2 – 2,5 года после операции [59, 60].

Сообщения о клиническом применении трансплантации аутохондроцитов у больных РА носит единичный характер. E. Paresce с соавт. [49] для восстановления суставного хряща при РА применили методику, аналогичную способу замещения травматического дефекта. In vitro был приготовлен комплекс из матрикса, содержащего ГАГ, и культуры культивированных хондроцитов. Комплекс помещался на дефект хряща и покрывался сверху надкостницей, которая фиксировалась к хрящу. По такой методике было

прооперировано 11 больных РА, однако отдаленные результаты лечения не опубликованы [49].

Заключение

Восстановление суставного хряща является комплексной задачей, для решения которой требуется проведение большого количества мероприятий. Их объем зависит от характера патологического процесса. Для ликвидации травматического дефекта хряща может оказаться достаточной имплантация культуры клеток - дифференцированных хондроцитов или недифференцированных СК. В настоящее время для закрытия посттравматических дефектов применяется препарат картицел, который представляет собой культуру аутохондроцитов. Пересадка аутохондроцитов оказалась безопасной процедурой, которая приводит к образованию гиалинового хряща, способного к плотной интеграции с хрящевым покрытием сустава реципиента. Недостатком методики является необходимость проведения двух операций, а также то, что использование надкостницы в качестве покровного материала может осложниться ее оссификацией.

По сравнению с аутохондроцитами более перспективной выглядит применение стромальных СК и клеток-предшественников, которые относительно легко получают из костного мозга. Количество стромальных СК в течение нескольких дней может быть увеличено в тысячи раз. Методика трансплантации этих клеток не требует проведения хирургической операции. Культура клеток может быть введена в полость сустава путем инъекции, где клетки адгезируются на поверхности дефекта хряща и претерпевают

процесс дифференцировки. Культура стромальных СК позволяет закрыть дефекты хряща с относительно большой площадью [32].

Основным недостатком новообразованного хряща является его низкие механические свойства и недостаточная интеграция с хрящом реципиента. Для улучшения функциональных свойств хряща возможно применение средств генной инженерии и методов регулирования дифференцировки стромальных клеток для получения из них хондроцитов [32].

В отличие от травмы хряща, в условиях хронического воспаления при РА функциональная способность хондроцитов оказывается сниженной и их культивирование и пересадка представляют большие сложности. Аутоотрансплантация хондроцитов затрудняется тем, что собственные клетки поражены аутоиммунным процессом, поэтому более предпочтительной процедурой является аллотрансплантация, которая дает возможность взять клетки от здорового донора. Восстановление суставного хряща при РА является многоэтапным процессом, т.к. вначале необходимо подавление воспаления с помощью пересадки гемопоэтических клеток, после чего делается трансплантация клеток, которые продуцируют хрящ. По мнению С. Jorgensen с соавт. [32] применение СК может привести к полному излечению от аутоиммунных заболеваний.

Развитие экспериментальных работ оказывает влияние на решение клинических проблем. В настоящее время складывается ситуация, в которой для восстановления хряща в клинике необходимо иметь несколько полноценных методик с целью выбора наиболее показанной для данного больного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Викторов И.В., Сухих Г.Т. Медико-биологические аспекты применения стволовых клеток. Вестн. Акад. мед. наук, 2002, 24-30.
2. Виноградова Т.П. К вопросу о пластичности хрящевой ткани. Арх. анат., 1961, т. 40, 3, 73-81.
3. Волков М.В., Оганесян О.В. Лечение повреждений суставов и костей с помощью аппаратов авторов. Ташкент, 1978, 20.
4. Илизаров Г.А. Некоторые проводимые нами фундаментальные исследования и их общепатологическое значение. Курган, 1991, 125.
5. Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. М., 1996, 206.
6. Лопухин Ю.М. Этико-правовые основы проблемы стволовых клеток и "терапевтического клонирования". Мед. кафедра, 2002, 2, 6-9, 113-119.
7. Лучихина Л.В. Ранняя диагностика и патогенетическая терапия артроза. Автореф. дисс... д.м.н., М., 1998, 43.
8. Омеляненко Н.П. Ориентационный анализ ультраструктурной архитектоники волокнистой основы суставного хряща человека. Арх. анат., 1989, т. 97, 7, 39-47.
9. Омеляненко Н.П., Малахов О.А., Карпов И.Н., Сухих Г.Т., Кожевников О.В. Влияние фетальной костной ткани на репаративную регенерацию кости. Вестн. травматол. ортопед. им. Н.Н. Приорова. 2002, 1, 35-40.
10. Сигидин Я.А., Лукина Г.В. Базисная патогенетическая терапия ревматоидного артрита. М., 2000, 100.
11. Стецула В.И. Системные представления об организации аппарата движения. Адаптационно-компенсаторные и восстановительные процессы в тканях опорно-двигательного аппарата., Киев, 1984, 200.
12. Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. Спонтанная и индуцированная дифференцировка ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки. Докл. Акад. наук, 1969, 187, 2.
13. Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворения. М., 1977, 272.
14. А. Хэм, Д. Кормак. Гистология. М., 1983, т.3, 291.
15. Alleyne K., Galloway M. Management of osteochondral injuries of the knee, 2001, 20 (2), 343-364.
16. Barone L. Cultured autologous chondrocyte implantation for cartilage repair. Genzyme Tissue Repair, Cambridge, Mass, 1997, 1-8.
17. Bassler C., Franchimont P. In vitro study of chondrocyte functions. Osteoarthritis: a suitable case for treatment. Proc. XI Eur. Cong. Rheum., Athen, 1987, 25-35.
18. Blunk T., Sieminski A., Gooch K. et al. Differential effects of growth factors on tissue engineered cartilage. Tissue Eng., 2002, 8 (1), 73-84.
19. Bobic V. The utilisation of osteochondral autologous grafts in the treatment of articular cartilage lesions. Orthopade, 1999, 28 (1), 19-25.
20. Brittberg M., Lindahl A., Nilson A. et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. New Eng. J. Med., 1994, 331 (6), 889-895.
21. Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. Clin. Orthop, 1999, 367 (S), 147-155.
22. Buckwalter J., Mankin H. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. Instr. Course Lect., 1998, 47, 487-504.
23. Caplan A., Elyaderany M., Mochizuki Y. et al. Principles of cartilage repair and regeneration. Clin. Orthop. 1997, 342, 254-269.
24. Erlacher L., Ng C. K., Ulrich R. Presence of cartilage derived morphogenic proteins in articular cartilage and enhancement of matrix replacement in vivo. Arthr. Rheum., 1998, 41, 263-273.
25. Gilligly S.D., Voight M., Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. J. Orthop. Sports. Phys. Ther., 1998, 28 (4), 241-251.
26. Grande D., Pitman M., Peterson L. et al. The repair of

- experimentally produced defects in rabbit cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J. Orthop. Res.*, 1989, 7, 208 - 218.
27. Grodzinsky A., Levenston M., Jin M., Frank E. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, 2000, 2, 691 - 713.
28. Hosaka N., Nose M., Kyogoku M. et al. Thymus transplantation, a critical factor for correction of autoimmune disease in MRL- mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93, 8558 - 8562.
29. Ishida T., Inaba M., Sugiura K. et al. Requirement of donor derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. *J. Immunol.*, 1994, 15, 3119 - 3127.
30. Ikehara S. Bone marrow transplantation for autoimmune diseases. *Acta Haematol.*, 1998, 99, (3), 116 - 132.
31. Jimenez S. Biochemical aspects of repair and its cellular control. Osteoarthritis: a suitable case for treatment. *Proc. Symp. XI Eur. Cong. Rheum.*, Athen, 1987, 19 - 25.
32. Jorgensen C., Noel D., Apparailly F., Sany J. Stem cells for repair of cartilage and bone. *Ann. Rheum. Dis.*, 2001, 60, 305 - 309.
33. Kamil S., Aminuddin B., Bonassar L. et al. Tissue engineered human articular cartilage demonstrates euploidy by flow cytometry. *Tissue Eng.* 2002, 8, (1), 85 - 92.
34. Kaps C., Bramlage T., Smolian H. et al. Bone morphogenic proteins promote cartilage differentiation. *Arthr. Rheum.*, 2002, 46 (1), 149 - 162.
35. Kim H., Song Y. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1999, 42 (7), 1528 - 1537.
36. Kim S., Kim S., Evans C. et al. Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4. *J. Immunol.*, 2001, 166, 3499 - 3505.
37. Leitman S., Yanagishita M., Campath T. et al. Stimulation of proteoglycan synthesis in explants of porcine articular cartilage by recombinant osteogenic protein-1. *J. Bone Joint Surg.*, 1997, 79, 11, 1132 - 1137.
38. Luyten F., DellAccio F., De Bari C. Skeletal tissue engineering: opportunities and challenges. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2001, 15 (5), 7559 - 7569.
39. Lyyra T., Jurvelin J., Pitkanen P. et al. Indentation instrument for measurement of cartilage stiffness under arthroscopic control. *Med. Eng. Phys.*, 1995, 17, 395 - 399.
40. Mandelbaum B., Browne J., Fu F. et al. Articular cartilage lesions of the knee. *Amer. J. Sports Med.*, 1998, 26, (6), 853 - 861.
41. Minas T. Nonarthroplasty management of knee arthritis in the young individual. *Curr. Opin. Orthoped.*, 1998, 9, 46 - 52.
42. Minas T., Neher S. Current concept in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics*, 1997, 20 (6), 525-538.
43. Muller-Lander U., Kriegsmann J., Franklin B. et al. Synovial fibroblasts of patients with RA attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am. J. Pathol.*, 1996, 149, (5), 1607 - 1615.
44. Muller-Lander U., Roberts C., Franklin B. et al. Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J. Immunol.*, 1997, 1, 158 (7), 3492 - 3498.
45. Nerem R., Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substances. *Tissue Eng.*, 1995, 1, 1, 3 - 12.
46. Noguchi T., Oka M., Fujino M. Repair of osteochondral defects with grafts of cultured chondrocytes. *Clin. Orthop.*, 1994, 302, 251 - 258.
47. O'Driscoll S., Keely F., Salter R. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts. *J. Bone Joint Surg.*, 1986, 68-A, 1017 - 1035.
48. Pap T., Franz J., Hummel K. et al. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthr. Res.*, 2002, 2 (1), 59 - 64.
49. Paresce E., Murgo A., Fantini F. et al. Cartilage transplants in rheumatic diseases. Surgical approaches in osteoarthritis. Milano, 2002, 141 - 143.
50. Ranger A., Gerstenfeld L., Wang J. et al. The nuclear factor of activated T-cells transcription factor NFATp is a repressor of chondrogenesis. *J. Exp. Med.*, 2000, 191, 9-21.
51. Salter R., Harris D., Clements H. The healing of bone and cartilage in transarticular fractures with continuous passive motion. *Orthop. Transpl.*, 1978, 2, 77 - 90.
52. Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J. et al. From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 10, 97 (21), 11307 - 11312.
53. Soder O., Madsen K. Stimulation of chondrocyte DNA synthesis by IL-1. *Rheumatology*, 1988, 27, 21 - 26.
54. Solchaga L., Gao J., Dennis J. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng.*, 2002, 8 (2), 333 - 347.
55. Sittlinger I. Tissue engineering: artificial tissue replacement containing vital components. *Laringorhinootologie*, 1995, 74 (11), 695 - 699.
56. Steadman J., Rodkey W., Rodrigo J. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin. Orthop.*, 2001, 391 (suppl), 362- 369.
57. Stem cells and the future of regenerative medicine. *Natl. Acad. Sci.*, 2002.
58. Stem cells: scientific progress and future research directions. *Dept. Health Hum. Serv. Natl. Inst. Health*, June, 2001.
59. Svensson B., Adell R. Costochondral grafts to replace mandibular condyles in juvenile chronic arthritis patients. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 1998, 26 (5), 275 - 285.
60. Svensson B., Feldman G., Rindler A. Early surgical orthodontic treatment of mandibular hypoplasia in juvenile chronic arthritis. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 1993, 21 (2), 67 - 75.
61. Thompson J., Itskowitch-Eldor J., Shapiro S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. *Science*, 1998, 282, 1145 - 1147.
62. Vanbeuningen H., Glansbeek H., Vander Kraan P. et al. Osteoarthritis like change in the murine knee joint resulting from the intraarticular TGF injection. *Osteoarthritis*, 2000, 8, 25 - 33.
63. Verschure P., Marle J., Joosten L. et al. Localisation of insulin-like growth factor-I receptor in human normal and osteoarthritic cartilage. *Brit. J. Rheum.*, 1996, 35, 1044 - 1055.
64. Volpi P. Cartilage transplants in sport diseases. Surgical approaches in osteoarthritis. Milano, 2002, 145 - 147.
65. Weissman I. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic. *Science*, 2000, 287, 1442 - 1446.
66. Zuk P., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue. *Tiss. Eng.*, 2001, 7, (2), 211 - 228.