

8. *Щелкунов С. И.* Об особенностях цитогенеза нормальных и малигнизированных структур // Развитие клеток нормальных и опухолевых тканей. Труды Военно-медицинской ордена Ленина академии им. С. М. Кирова. Т. 165. 1965. С. 11–28.
9. *Щелкунов С. И.* Цитологический и гистологический анализ развития нормальных и малигнизированных структур. — Л.: Медицина, 1971.
10. *Aragona F., De Caro R., Parenti A.* et al. Structural and ultrastructural changes in ileal neobladder mucosa: a 7-year follow-up // *Br. J. Urol.* 1998. V. 81. P. 55–61.
11. *Garg P., Ravi A., Patel N. R.* et al. Matrix metalloproteinase-9 regulates MUC-2 expression through its effect on goblet cell differentiation // *Gastroenterol.* 2007. V. 132. P. 1877–1889.
12. *Hajime Y., Kazuhide H.* Effect of MMP/ADAM Inhibitors on Goblet Cell Hyperplasia in Cultured Human Bronchial Epithelial Cells // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004. V. 86. P. 2024–2031.
13. *Ikeda H., Sasaki M., Ohira S.* et al. Tumor necrosis factor-alpha induced the aberrant expression mucus core protein-2 in non-neoplastic biliary epithelial cells via the up-regulation of CDX2 in chronic cholangitis // *Hepatology Res.* 2008. In press.
14. *Keshav S.* Paneth cells: leukocyte-like mediators of immunity in the intestine // *J. Leukocyte biology.* 2006. V. 80. P. 500–508.
15. *Kondo Y., Yoshimoto T., Yasuda K* et al. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system // *Int. Immunol.* 2008. V. 20. P. 791–800.

*Деев Р. В.¹, Гололобов В. Г.², Цупкина Н. В.³, Бозо И. Я.¹,
Гребнев А. Р.¹, Исаев А. А.⁴, Сергеев В. С.¹, Пинаев Г. П.³*

ГИСТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРИНЦИП СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ СКЕЛЕТНЫХ ТКАНЕЙ

¹*Кафедра патологической анатомии (начальник — проф. С. А. Повзун);*

²*кафедра гистологии с курсом эмбриологии (заведующий — проф. Р. К. Данилов) Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург;* ³*отдел клеточных культур (заведующий — проф. Г. П. Пинаев) НИИ цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

⁴*ОАО Институт стволовых клеток человека (генеральный директор — А. А. Исаев), Москва*

Реконструктивная хирургия в последнее десятилетие обогатилась новыми подходами к лечению обширных повреждений органов опорно-двигательного аппарата [3]. Особое место среди них занимает тканевая инженерия — раздел биотехнологии (клеточных технологий), следующий принципу культивирования и пересадки клеток на биосовместимом носителе с целью создания *de novo* поврежденного органа или его части [2, 18]. Тканевая инженерия в травматологии и ортопедии уже продемонстрировала успехи в лечении больных, ранее считавшихся практически incurable [15, 19]. Вместе с тем фундаментальные общебиологические подходы к созданию подобных технологий еще далеки от совершенства, во многом из-за сформированного суждения о том, что новые исследования, по мнению некоторых авторов, опрокидывают исторически сложившуюся систему взглядов на гистогенез, создают новую парадигму развития и организации тканей [6, 7].

Гистогенез (*in vivo* — эмбриональный и репаративный) представляет собой комплекс координированных во времени и пространстве процессов пролиферации, клеточного роста, миграции, межклеточных взаимодействий, дифференцировки, запрограммированной клеточной гибели и некоторых других [4]. В культуре *in vitro*, при создании тканеинженерных «аналогов» тканей эти процессы также реализуются. Разумеется, их проявление носит редуцированный характер, поскольку воспроизвести в полном объеме все многообразие регуляторных факторов микроокружения в культуре невозможно, что было отмечено еще А. А. Максимовым в 1916 г. [5]. Однако даже в этих условиях при создании «аналогов» монодифферонных (хрящевые) и полидифферонных (костные) тканей проявляются общебиологические закономерности гистогенеза, а именно пролиферацию, рост, морфофункциональные преобразования, включая выработку компонентов матрикса, свидетельствующие об определенной дифференцировке, поскольку они жестко детерминированы в геноме.

Тканеинженерный продукт — это результат совмещения в одном изделии клеток, индуцированных по пути направленной дифференцировки и материала-носителя, выполняющего, кроме прочего, роль трехмерного организатора индуцированного гистогенеза уже в ране. Технология изготовления тканеинженерных эквивалентов скелетных тканей подразумевает осуществление ряда этапов: выделения из тканей донора клеток, способных к дифференцировке в остео- и хондрогенном направлениях, их совмещение с материалом-носителем (иммобилизация) и последующая трансплантация всей конструкции (графтинг) [1, 14, 16].

Проблема выделения клеток в каждой лаборатории решается в соответствии с технологическими возможностями. В качестве клеточного материала используются мультipotентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), получаемые из костного мозга, жировой клетчатки, стромы пупочного канатика или плаценты и других источников. В отечественной научной литературе за ними закрепилось наименование «стволовые стромальные клетки» [9]. Их выделение возможно двумя путями: «пассивным» — основанным на способности к адгезии этих клеток к внутренней поверхности культурального сосуда; и «активным» — посредством иммуномагнитной сепарации, базирующейся на получении из костного мозга или иного источника клеток, экспрессирующих определенные молекулы — CD105, CD73, CD90, и не экспрессирующих маркеры клеток гемопоэтического ряда — CD45, CD34, CD14, HLA-DR и др. [11, 13].

В дальнейшем происходит накопление клеточной популяции, т. е. их пролиферация *in vitro*. Следующим этапом многие авторы предлагают осуществлять непосредственное совмещение клеток с материалом-носителем и трансплантацию, в расчете, что недифференцированные клетки, попав в микроокружение костной или хрящевой раны, дифференцируются по нужному направлению, активно включаются в процессы репаративного гистогенеза и станут полноценными участниками реституции. Однако, по нашему мнению, представляется целесообразным осуществление индукции направленной дифференцировки клеточной культуры еще *in vitro* с последующей пересадкой уже преддифференцированных клеток — «преостеобластов» и «прехондробластов» совместно с носителем.

К настоящему времени разработаны международно признанные протоколы индукции направленной остеобластической и хондробластической дифференцировки [10, 14]. Осуществляя ее, исследователь, в ограниченной степени, воспроизводит

естественный процесс эмбрионального или репаративного гистогенеза. При этом в экспериментальном гистогенезе *in vitro* реализуется общебиологический принцип дивергентной дифференцировки [8], когда под воздействием молекулярных факторов микроокружения ММСК развиваются либо по остеобластическому пути, либо по хондробластическому.

В условиях воспроизводства этого процесса *in vitro* пользуются стандартной тактикой (рис. 1). Для реализации остеогенных потенций ММСК *in vitro* в культуральную среду добавляют β -глицерофосфат натрия, L-аскорбат, дексаметазон, а для индукции хондрогенеза — TGF β , смесь «инсулин+трансферрин+селеновая кислота», L-аскорбат. Не следует забывать, что помимо химической индукции немаловажное значение имеет и физическая — сообщение культуре ММСК механических стимулов способствует их остеогенной дифференцировке, что реализуется через «растормаживание» остеобласт-специфичных генов [12, 17].

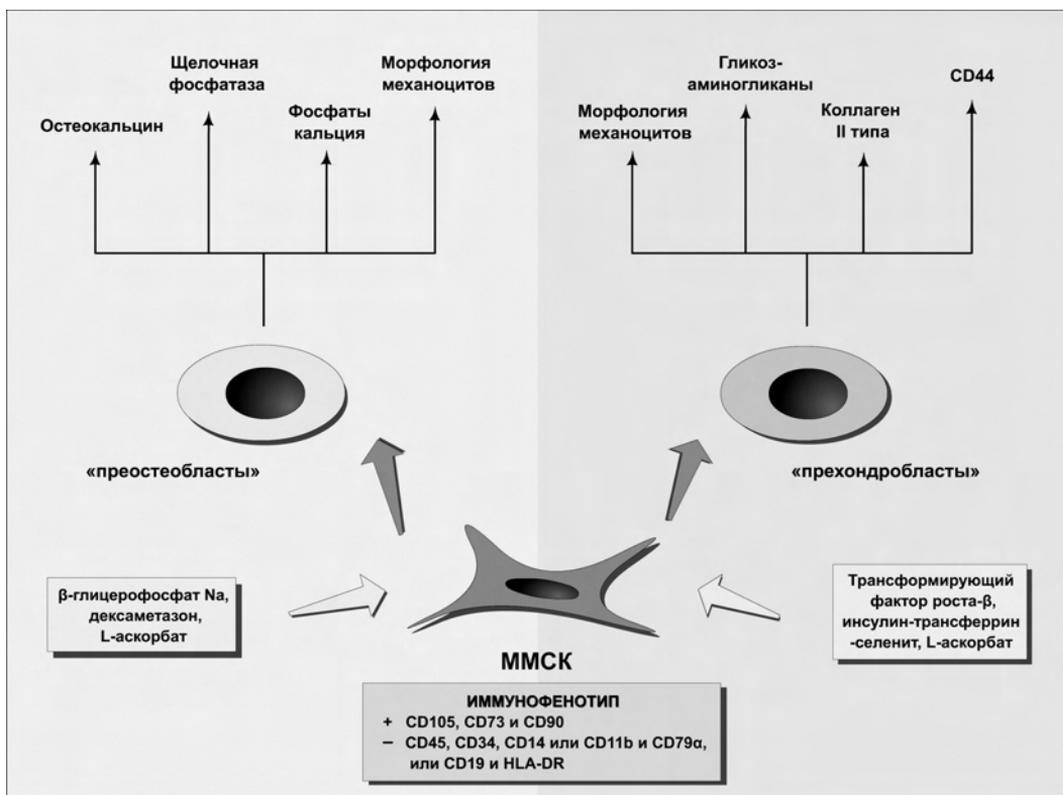


Рис. 1. Схема дивергентной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) *in vitro*

В своих исследованиях мы осуществляли индукцию остеогенной дифференцировки в условиях *in vitro* после надежного совмещения культуры клеток с трехмерным материалом-носителем — деминерализованным костным матриксом. Последнее доказано при помощи трансмиссионной электронной микроскопии, а индукцию хондрогенной дифференцировки — после помещения клеточной взвеси в гелеобразный носитель.

Результаты индуцирования дифференцировки могут быть подтверждены различными методами при детекции фенотипических ответов полученной популяции клеток. Клетки приобретают типичную для механоцитов ультраструктуру — ядро, богатое эухроматином, развитую гранулярную эндоплазматическую сеть, признаки выделения в межклеточный матрикс фибриллярных и нефибриллярных белков (рис. 2). Кроме того, проводят идентификацию специфичных продуктов синтеза: для остеобластов — щелочной фосфатазы, неколлагеновых белков — остеокальцина, остеопонтин, костного сиалопротейна и др., выявляют способность формировать межклеточные преципитаты фосфатов кальция. Для хондробластов — синтез коллагена II типа, гликозаминогликанов, характерных поверхностных адгезионных молекул (CD44) и др.

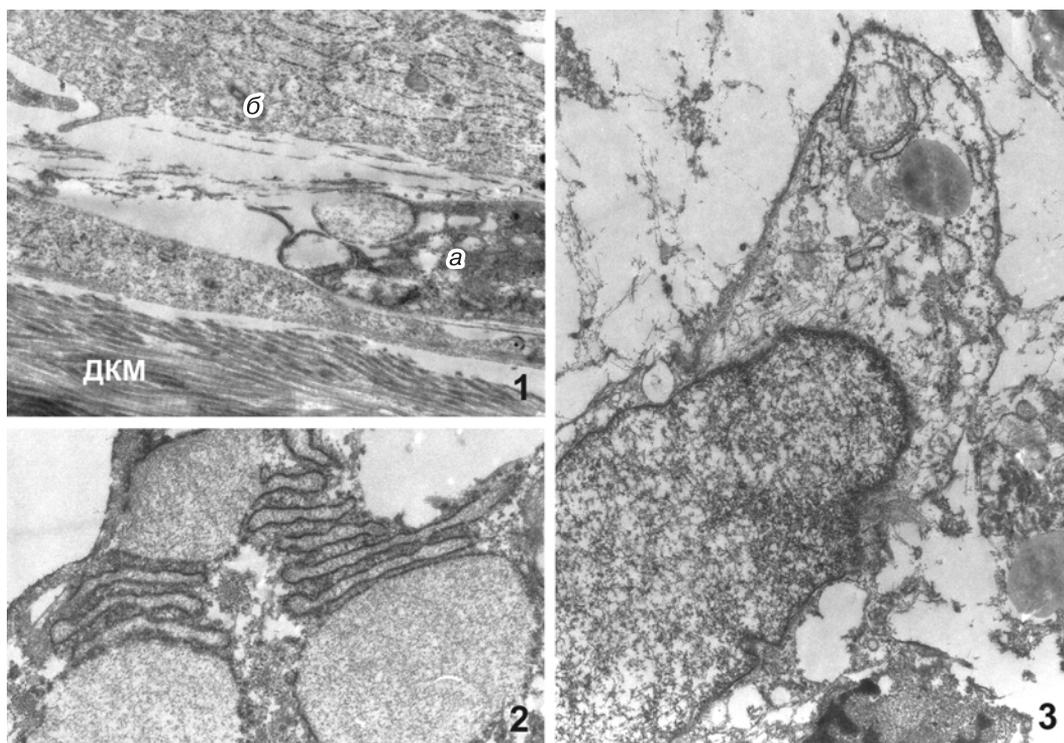


Рис. 2. Ультраструктура преддифференцированных *in vitro* механоцитов (ув.: 1, 3 — 3000, 2 — 12000):

- 1 — остеогенные клетки на поверхности деминерализованного костного матрикса (ДКМ);
 2 — участок цитоплазмы хондрогенной клетки с хорошо развитой гранулярной эндоплазматической сетью; 3 — хондрогенная клетка среди компонентов синтезированного межклеточного вещества; а — участок цитоплазмы клетки с расширенными цистернами комплекса Гольджи и признаками экстррузии синтезированного продукта; б — участок цитоплазмы клетки с развитой гранулярной эндоплазматической сетью

Таким образом, при создании тканеинженерных эквивалентов скелетных тканей, *in vitro* в редуцированной форме реализуется гистогенетический принцип естественного развития костной и хрящевой тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бозо И. Я., Деев Р. В., Цупкина Н. В.* и др. Этапы создания тканеинженерных эквивалентов скелетных тканей для травматологии и ортопедии. Аутологичные стволовые и прогениторные клетки: экспериментальные и клинические достижения // Мат. Всероссийской школы-конференции. Москва, 9–11 июня 2008. С. 24.
2. *Волков А. В.* Тканевая инженерия: новые перспективы развития медицины // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005. № 1. С. 57–63.
3. *Деев Р. В., Исаев А. А., Кочиш А. Ю., Тихилов Р. М.* Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. Т. 2. № 4. С. 18–30.
4. *Клишов А. А.* Гистогенез и регенерация тканей. — Л.: Медицина, 1984.
5. *Максимов А. А.* О культивировании *in vitro* соединительной ткани взрослых млекопитающих. — СПб., 1916.
6. *Репин В. С., Сухих Г. Т.* Медицинская клеточная биология. — М.: 1998.
7. *Сухих Г. Т., Малайцев В. В., Богданова И. М., Дубровина И. В.* Мезенхимальные стволовые клетки // Бюл. эксперим. биол. 2002. Т. 133. № 2. С. 124–131.
8. *Хлюпин Н. Г.* Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. — Л.: Изд-во АН СССР, 1946.
9. *Фриденштейн А. Я.* Стволовые остеогенные клетки костного мозга // Онтогенез. 1991. № 2. С. 189–197.
10. *Archer C. W., Old S., Redman S.* et al. Isolation, characterization, and culture of soft connective tissue stem/progenitor cells. Culture of human stem cells. Ed. Freshney R. I., Stacey G. N., Auerbach J. M. Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons Inc. 2007. P. 187–206.
11. *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. V. 8. № 4. P. 315–317.
12. *Grayson W. L., Grayson W. L., Ma T., Bunnell B.* Human mesenchymal stem cells tissue development in 3D PET matrices // Biotechnol. Prog. 2004. V. 20. № 3. P. 905–912.
13. *Horwitz E. M., Le Blanc K., Dominici M.* et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2005. V. 7. № 5. P. 393–395.
14. *Larson B. L., Ylöstalo J., Prockop D. J.* Human Multipotent Stromal Cells (MSCs) Undergo Sharp Transition from Division to Development in Culture // Stem Cells. 2008. V. 26. № 1. P. 193–201.
15. *Lendeckel S., Jödicke A., Christophis P.* et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report // J. Cranio-Maxillofac. Surg. 2004. V. 32. № 6. P. 370–373.
16. *Logeart-Avramoglou D., Anagnostou F., Bizios R., Petite H.* Engineering bone: challenges and obstacles // J. Cell. Mol. Med. 2005. V. 9. № 1. P. 72–84.
17. *Mauney J. R., Sjöstrom S., Blumberg J.* Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3D partially demineralized bone scaffolds *in vitro* // Calcif. Tissue Int. 2004. V. 74. № 5. P. 458–468.
18. *Vacanti J. P.* Editorial: tissue engineering: a 20-year personal perspective // Tissue Eng. 2007. V. 13. № 2. P. 231–232.
19. *Warnke P. H., Springer I. N., Wiltfang J.* Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man // Lancet. 2004. V. 364. № 9436. P. 766–770.