

**ПЕРСПЕКТИВИ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ ТА ЖИВИХ ТКАНИННИХ  
ЕКВІВАЛЕНТІВ ЗА ЛІКУВАННЯ ДЕФЕКТІВ ХРЯЩА  
(перспективи напрямку)**

**Д.О. Зубов, О.А. Костогриз, О.В.Солодуха, здобувач\***  
**Національний університет біоресурсів**  
**і природокористування України**  
**ДУ “Інститут генетичної та регенеративної**  
**медицини НАМН України”**  
**ДУ “Інститут травматології та ортопедії НАМН України”**

*Розглянуто висвітлені у літературних джерелах сучасні погляди щодо відновлення травматичних дефектів гіалінового хряща і методи культивування хондроцитів, їх диференціація за довготривалого субкультивування та існуючі підходи щодо моделювання штучного хряща (тканинних еквівалентів хряща) ex vivo.*

**Клітинна терапія, тканинні еквіваленти, дефект, хрящ, собаки.**

Хрящ дорослої тварини має низьку здатність до відновлення та регенерації. Це пояснюється обмеженим потенціалом хондроцитів, їх здатністю катаболічно реагувати на патологічні медіатори. Експериментальні дослідження доводять, що поверхневі рани суглобового хряща, звичайно спричиняють селективну втрату протеогліканів із матриксу, з подальшим неадекватним процесом проліферації та відновлення тканини. Більш глибокі дефекти суглобового хряща (до субхондральної кістки) з ушкодженням кровоносних судин і кісткового мозку спонукають до формування фіброзної хрящової тканини, а більш функціональний хрящ формується у менших за об'ємом дефектах [13,19]. Для відновлення хряща розроблено різні хірургічні методи (абразивна артропластика, мікропереломи, пересадка кістково-хрящових трансплантатів), але все це залежить від техніки виконання та застосовується при незначних ушкодженнях [17].

**Мета дослідження** – вивчення новітніх підходів у лікуванні набутих дефектів хряща, імплантації інертних замінників, обробка лікарськими препаратами чи компонентами матриксу з метою місцевої стимуляції тканинної регенерації, аутологічна пересадка клітин чи тканини, чи in vitro виробництво тканини або тканинних еквівалентів для імплантації.

**Матеріали і методи дослідження.** Об'єкт дослідження – літературні джерела з питань набутих дефектів хряща колінного суглоба

---

\*Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор О.Ф.Петренко.

та їх заміщення культивованими хондроцитами у собак. Методи – аналітичні.

Оперативні втручання на колінному суглобі собак та подальше їх утримання проводилися на базі кафедри хірургії ім. І. О. Поваженка НУБіП України протягом 2010–2012 років.

Вирощували хондроцити для заміщення дефектів гіалінового хряща колінного суглоба на базі інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України. Експериментальні дослідження проводили спільно із співробітниками Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України та Інституту травматології та ортопедії НАМН України.

**Результати дослідження.** Одним із перших прикладів застосування клітинної терапії є лікування дефектів суглобового хряща.

Культивування хондроцитів. Для відновлення хрящових дефектів нині використовують різні біологічні препарати: хрящовий аутоотрансплантат, хрящовий алотрансплантат, перихондрій, періост, свіжовиділені або культивовані хондроцити, прогеніторні або прекурсорні клітини кісткового мозку, хондроіндуковані дермальні фібробласти.

Хоча прогрес у сфері тканинної інженерії хряща був повільним, ентузіазм у використанні свіжовиділених або розігнаних клітин не згасав ніколи, оскільки хондроцити мають гарну життєздатність при трансплантації [7]. Дефекти зроблені у хрящі та заповнені культивованими хондроцитами, виявили значний ступінь відновлення тканини із властивостями нормального хряща [6]. У цих дослідженнях 80 % хряща було відновлено, застосовуючи аутологічні хондроцити, порівняно із контрольними 18 % без пересадки. Перші досліди клінічного застосування культивованих аутологічних хондроцитів надали результати від чудових до добрих. Отже, із експериментальних та клінічних досліджень випливає, що хондроцити дорослої тварини можуть бути розмножені *in vitro* та використані для виробництва хряща *in vivo*.

Але існують критичні вимоги для успішного культивування хондроцитів *in vitro*. Помірна посівна щільність та часте субкультивування звичайно оптимізують ріст більшості клітинних типів. Якщо такий же підхід застосувати і до хондроцитів, то можлива прогресуюча та незворотна втрата їхніх функцій. Моношарові культури пасованих хондроцитів нездатні утворювати хрящовий матрикс, цей феномен був описаний як дедиференціація хондроцитів *in vitro* [8]. Десятиріччями було відомо, що хондрогенез можна стимулювати безпосередньо посівом хондроцитів у високій щільності [16], підвішених у розчині [9], ізольованих у хондронах або культивованих як осад [8]. Тобто умови, здатні підтримувати відповідний фенотип, звичайно не узгоджуються з такими, що сприяють збільшенню кількості клітин. Внаслідок цього з'являються обмеження у кількості необхідних клітин, які можуть бути вирощені *in vitro* для подальшого заповнення хрящового дефекту [9].

Для багатомасштабного отримання клітин, насамперед тих, що ростуть у суспензії, звичайно використовують біореактори, що

забезпечують перемішування з метою поліпшення ступеня проліферації і отримання клітин, але динаміка току рідини може бути не сприятливою для морфогенезу тканини. Вчені із NASA розробили культуральний прилад із зниженим ступенем навантаження на тканину, що називається – ємкістю зі стінками, що крутиться (Rotating-Wall Vessel, RWVs), що утримує прискорену проліферацію і організацію клітин у диференційовану тканину [5]. Унікальні умови, що забезпечують RWVs, стимулюють хондроцити до формування крупних 5мм агрегатів хряща у суспензії [1]. Як джерело хондрогенних клітин можна розглянути змогу диференціювання хондроцитів з інших клітинних типів. Доведено, що субпопуляції клітин із кісткового мозку [18] та м'язових клітин-супутниць [20] здатні трансдиференціюватись у хондроцити. Відомо, що дермальні фібробласти собаки здатні продукувати хрящовий матриксний хондроїтин-сульфат після культивування з остеоіндуктивним демінералізованим кістковим матриксом [4]. Така моношарова система має обмеження, бо не оптимізує контакт між остеоіндуктивним матриксом з клітиною-мішенню. У зв'язку з цим розроблена тривимірна система (3D) у вигляді губки: колаген/демінералізована кісткова пудра, що дала змогу проводити культивування у високій щільності з добрим обміном живильними речовинами між клітинами та середовищем [10]. Вона здатна підтримувати міграцію та хондроіндукцію термальних фібробластів тварини. Отже, фібробласти із біопсії шкіри можуть бути нарощеними *in vitro* у великій кількості з подальшим диференціюванням у хондроцити через їх інкубацію з демінералізованою кісткою або ж з іншими чинниками диференціювання або хондрогенного трансгенезу. Отримані у такий спосіб хондроцити можуть бути джерелом аутологічних клітин для моделювання хрящової тканини пацієнта.

*Моношарова культура хондроцитів.* Диференційований фенотип хондроцитів характеризується синтезом колагену II типу та тканиннотспецифічних протеогліканів, а також низьким рівнем мітотичної активності. Є дані, що при тривалому субкультивуванні хондроцити втрачають свою сферичну форму, та набувають подовжену фібробластоподібну форму. Культивування хондроцитів, підвишених у рідкому середовищі або у натуральному або штучному тривимірному матриксі стабілізує його фенотип. Клітини зберігають свою сферичну форму, синтезують тканинотспецифічні білки. Культури хондроцитів у натуральних або синтетичних абсорбуючих полімерах використовують для імплантації клітин у дефекти хряща для стимуляції регенерації хрящової тканини суглоба.

Можливе культивування хондроцитів на мікроносіях. Як мікроносії використовують декстранові буси (цитодекс III), безпорові мікросфери колагену I типу (целаген). У цих умовах культивування хондроцити прикріплюються до поверхні носія, зберігають свою сферичну форму та виробляють матриксотподібний матеріал. Целаген сприяє проліферації хондроцитів та реекспресії нормального фенотипу. Тому культивування хондроцитів на мікросферах zcelaгену можна використовувати для відновлення фенотипу клітин перед трансплантацією.

Хондроцити можна культивувати підвішеними у тривимірному матриксі (м'який агар, агароза, колагеновий гель або губка, гіалуронова кислота, фібриновий клей, бусини альгілату). Натуральні гідрогелі, такі як альгінат [2], фібрин [15], колагенові гелі або суміші [3] є корисними для підтримки та імобілізації клітинних суспензій. *In vitro* властивості альгінатних/фібринових гранул посилюються добавками, подібними до гіалуронату [12].

Тривимірні підложки, як носії клітин, використовуються для встановлення просторової конфігурації нової тканини. Вони потенційно здатні посилювати дозрівання та функціонування регенеруючої тканини. Потенціальні підложки або матриці містять натуральні полімерні матеріали (девіталізований хрящовий матрикс для хондроцитіндукованого неохондрогенезу [14]), синтетичні полімерні матеріали (перевага в якості складу, його точного контролю та властивостей матеріалу, а також біосумісності та резорбційних властивостей), біодеградуючі полімери (ступінь деградації має збігатись із запланованим часом використання) та полімери із синтетичних матеріалів найширше вивчено полігліколієву кислоту, полімолочну кислоту та їх сополімери. Полігліколієвокислі матриці використовуються для формування неохряща хондроцитами.

### **Висновки**

Сучасний прогрес у сфері тканинної інженерії дає змогу розвивати проблемні аспекти моделювання та трансплантації штучного хряща. Успіхи у розробці матеріалів допоможуть у подальшому створити "розумну" підложку, яка самостійно буде контролювати топологію тканини, буде здатна стимулювати клітинну адгезію, диференціювання та проліферацію. Отже, лікування дефектів суглобового хряща методами клітинної терапії є найперспективнішими, враховуючи клітинну гомогенність та аваскулярність хрящової тканини.

### **Список літератури**

1. Baker T.L., Three-dimensional culture of bovine chondrocytes in rotating-wall vessels / T.L. Baker, T.J. Goodwin // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 1997. – Vol. 33. – P.358–365.
2. Synthesis of collagen by bovine chondrocytes cultured in alginate; posttranslational modifications and cell-matrix interaction / B. Beekman, N. Verzijl, R.A. Bank, von der K. Mar, J.M. TeKoppele // *Exp. Cell Res.* – 1997. – Vol. 25. – P. 135–141.
3. Chalain T. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and kappa-elastin / T. Chalain, J.H. Philips, A. Hinck // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1999. – Vol. 44. – P. 280–288.
4. Glowacki J. Cellular reactions to bone-derived material / J. Glowacki // *Clin. Orthop.* – 1996. – Vol. 324. –P. 47–54.
5. Goodwin T.J. Morphologic differentiation of colon carcinoma cell lines HT-29 and HT-29KM in rotating-wall vessels / T.J. Goodwin, J.M. Jessup, D.A. Wolf // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 1992. – Vol. 28. – P. 47–60.

6. Grande D.A. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation / D.A. Grande, M.I. Pitman, L. Peterson, D. Menche, M. Klein // J. Orthop. Res. – 1989. – Vol. 7. – P. 208–218.
7. Green W.T. Jr. Articular cartilage repair: behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting / W.T. Jr. Green // Clin. Orthop. – 1977. – Vol. 124. – P. 237–250.
8. Holtzer H. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro I. Dedifferentiation of cartilage cells / H. Holtzer, J. Abbott, J. Lash, A. Holtzer // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1960. – Vol. 46. – P. 1533–1542.
9. Horwitz A.L. The growth of cartilage cells in soft agar and liquid suspension / A.L. Horwitz, A. Dorfman // J. Cell Biol. – 1970. – Vol. 45. P. 434–438.
10. Kim Y.J. The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression / Y.J. Kim, L.J. Bonassar, A.J. Grodzinsky // J. Biomech. – 1995. – Vol. 28. – P. 1055–1066.
11. Lanza R.P., Langer R., Chick W.L., editors. Principles of tissue engineering. – Austin: R.G. Landes Company and Academic Press, 1997.
12. Lindenhayn K. Retention of hyaluronic acid in alginate beads: aspects for in vitro cartilage engineering / K. Lindenhayn, C. Perka, R. Spitzer, H. Heilmann, K. Pommerening, J. Mennicke [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 1999. – Vol. 44. – P. 149–155.
13. Peretti G.M. Biomechanical analysis of a chondrocyte-based repair model of articular cartilage / G.M. Peretti, L.J. Bonassar, E.M. Caruso, M.A. Randolph, C.A. Trahan, D.J. Zaleske // Tissue Eng. – 1999. – Vol. 5. – P. 317–326.
14. Peretti G.M. Bonding of cartilaginous matrices with cultured chondrocytes: an experimental model / G.M. Peretti, M.A. Randolph, E.M. Caruso [et al.] // J. Orthop. Res. 1998. – Vol. 16. – P. 89–95.
15. Perka C. Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants / C. Perka, R.S. Spitzer, K. Lindenhayn [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 2000. – Vol. 49. – P. 305–311.
16. Solursh M. Effects of cell density on the expression of differentiation by chick embryo chondrocytes / M. Solursh, S. Meier // J. Exp. Zool. – 1974. – Vol. 187. – P. 311–322.
17. Smith G.D. A clinical review of cartilage repair techniques / G.D. Smith, G. Kuntsen, J.B. Richardson // J. Bone Joint Surg. – 2005. – Vol. 87–B, № 4. – P. 445–449.
18. Wakitani S. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage / S. Wakitani, T. Goto, S.J. Pineda [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 1994. – Vol. 76. – P. 579–592.
19. Yang G.Y. Long-term clinical observation on the repair of large articular cartilage defects of the hip and the knee with free autogeneous periosteum / G.Y. Yang, S.B. Lu, J.F. Wang // Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. – 2004. – Jan;18(1):8–11.
20. Young H.E. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs / H.E. Young, M.L. Mancini, R.P. Wright [et al.] // Dev. Dyn. – 1995. – Vol. 202. – P. 137–144.

*Рассмотрены источники и методы культивирования хондроцитов, их дедифференциация при длительном субкультивировании и существующие подходы к моделированию искусственного хряща (тканевых эквивалентов хряща) ex vivo.*

***Клеточная терапия, тканевые эквиваленты, дефект хряща, собаки.***

Summary. The chondrocyte source and culture methods, their dedifferentiation during long time subculturing and the modern approaches to artificial cartilage modeling (living cartilage tissue equivalents) ex vivo are discussed in the article.

***Cell therapy, tissue equivalents, defect, cartilage, dog.***