

Khavinson Vladimir Kh.
St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology of the North-Western Branch
of the Russian Academy of Medical Sciences
Prof., MD
3, Dynamo pr., Saint Petersburg, Russian Federation, 197110
ibg@gerontology.ru

Tkachenko Evgeniy L.
GAUZ SO Center providing specialized types of medical care «Institute for Medical Cell
Technologies»
22a, Karla Marksa st., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026
evletk002@mail.ru

Gavrilov Iliya V.
GAUZ SO Center providing specialized types of medical care «Institute for Medical Cell
Technologies»; GBOU VPO Ural State Medical University
Doc. Ph.D.
22a, Karla Marksa st., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026
given18@yandex.ru

Zharkov Sergey V.
GAUZ SO Center providing specialized types of medical care «Institute for Medical Cell
Technologies»; GBOU VPO Ural State Medical University
22a, Karla Marksa st., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026
zharkov_sergey@list.ru

Katireva Yulia E.
GAUZ SO Center providing specialized types of medical care «Institute for Medical Cell
Technologies»

22a, Karla Marksa st., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026
y.katyreva@mail.ru

Verzhbitskaya Tatiana Yu.
GAUZ SO Center providing specialized types of medical care «Institute for Medical Cell
Technologies»
Ph.D.
22a, Karla Marksa st., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026
uralverba@gmail.com

Popov Alexander M.
GAUZ SO Center providing specialized types of medical care «Institute for Medical Cell
Technologies»
Ph.D.
22a, Karla Marksa st., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026
uralcytometry@gmail.com

Saveliev Leonid I.
GAUZ SO Center providing specialized types of medical care «Institute for Medical Cell
Technologies»
Ph.D.
22a, Karla Marksa st., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026
sav7000@yandex.ru

Fechina Larisa G.
GAUZ SO Center providing specialized types of medical care «Institute for Medical Cell
Technologies»
Ph.D.
22a, Karla Marksa st., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026
imct@celltechnologies.ru

617-089.844

Омельяненко Н.П., Ильина В.К., Ковалев А.В., Родионов С.А., Иванов А.В., Хлыстова А.В.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОБСТВЕННО СОЕДИНИТЕЛЬНОВУСЛОВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК (ССТК) ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОВРЕЖДЕННОЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

ФГБУ «Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова», г. Москва, Российская Федерация

Резюме. В настоящее время в регенеративной медицине широко используются культуры собственно соединительнотканых клеток (ССТК), полученные из источников различной локализации. Изучение поведения ССТК при культивировании и влияния на них различных факторов, сопровождающих этот процесс, будет способствовать глубокому пониманию механизмов их терапевтического действия и, следовательно, расширит области применения клеточной терапии. Показано, что ССТК из различных разновидностей соединительных тканей многократно меняли свою форму и взаиморасположение после выделения из ткани, при культивировании, пересевах и криоконсервации. Существенные изменения происходили в структурных элементах клеток. Они носили закономерный характер и присутствовали в ССТК, выделенных из всех разновидностей соединительной ткани. Полученные результаты позволили успешно использовать ССТК для восстановления поврежденных костей и суставных хрящей у экспериментальных животных и оптимизации репаративного остеогенеза при distractionно-компрессионном остеосинтезе у людей.

Ключевые слова: собственно соединительнотканые клетки (ССТК), культивирование клеток, регенеративная медицина, клеточная терапия, остеосинтез

Наиболее развитым направлением в клеточных технологиях, за исключением трансплантации костного мозга, является использование культивированных собственно соединительнотканых клеток (ССТК) при различных повреждениях соединительной ткани.

К ССТК относятся клетки, способные синтезировать основные компоненты межклеточного матрикса (ММ) (склеропротеины и глюкокопьюгаты) и участвующие в их структурировании. В широком понимании эти клетки называют фибробластами. В состав этой группы клеток входят их тканеогранные разновидности, включая предшественников: фибробласты волокнистой соединительной ткани, хондробласты/хондрциты, остеобласты/остеоци-

ты, липобласты/липоциты (рис. 1). Общим для этих клеток является их мезенхимное происхождение. Однако, некорректно называть ССТК во взрослом организме или любую их разновидность мезенхимными клетками, т.к. мезенхима является тканью эмбриона. В связи с широким использованием ССТК в регенеративной медицине различными специалистами, им было присвоено несколько названий с аббревиатурой МСК: мезенхимальные стволовые клетки, мультипотентные стволовые клетки, мезенхимальные стромальные клетки, мультипотентные стромальные клетки, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, Medicinal Signaling Cells. Все эти названия создают определенную путаницу в литературе и требуют гистологического пояснения, которым является термин — собственно соединительнотканые клетки.

Вне зависимости от источника получения ССТК обладают адгезивными свойствами и способны прикрепляться к стеклу или пластику после выделения из ткани и помещения в культуральный флакон. В связи с этим клетки могут быть культивированы и размножены в количестве, достаточном для имплантации в зону репаративной регенерации. Это позволяет использовать их для оптимизации репаративного процесса любой разновидности соединительной ткани, включая костную и хрящевую.

Несмотря на четко констатируемый клинический эффект при применении ССТК для стимуляции репаративной регенерации, механизм их действия остается до конца не выясненным. Как предположение, действие ССТК можно связать со стимуляцией ангиогенеза и пролиферации, которые определяют ход репаративного процесса за счет секреции ростовых факторов при кратковременном их переживании, а также выделении биологически активных веществ при их разрушении. Не исключается участие ССТК в качестве резидентных клеток, синтезирующих компоненты ММ. Приблизиться к пониманию этих механизмов возможно при исследовании морфологической динамики культивирования ССТК.

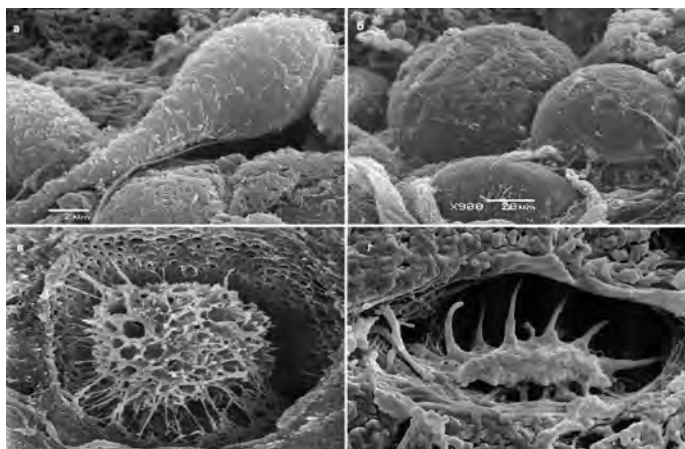


Рисунок 1. Типы собственно соединительнотканых клеток (ССТК). а — Репаративный фибробласт в заживающей кожной ране. СЭМ-микрофото x8000; б — Липоциты подкожной жировой клетчатки. СЭМ-микрофото x900; в — Хондроцит суставного хряща в клеточной лакуне. СЭМ микрофото x5000; г — Остеоцит в лакуне. СЭМ-микрофото x5000.

В процессе выделения из ткани, на всех этапах культивирования и сохранения в криобанке, ССТК подвергаются различным воздействиям. Это механическая обработка ткани, трипсинизация, изменения тканевого микроокружения, т.е. вместо естественной тканевой среды клетки окружают искусственной питательной средой, центрифугирование, как минимум при 200g, приводящее к агрегации клеток в конгломераты с изменением структуры от взаимного давления, пипетирование.

При первичном помещении выделенных ССТК в культуральную среду они приобретали шаровидную форму. Наблюдалось обводнение органелл и ядра. Цитоплазматическая мембрана без выраженных изменений. После прикрепления к поверхности дна культурального флакона ССТК уплотняются и распластываются. Цитоплазму можно четко разделить на эндо- и эктоплазму. Ядро также распластывается, но с некоторым запозданием по отношению к цитоплазме. Форма клеток достаточно вариабельна: многоугольная, отростчатая и др.

В специализированных структурно однородных соединительных тканях: в дерме, подкожно жировой клетчатке, роговице, склере, сухожилии, хряще, надкостнице и др. ССТК имеют большую однородность, чем в костном мозге, строма которого представлена волокнистой рыхлой неоформленной соединительной тканью. Ее межклеточный матрикс построен из тонких коллагеновых волокон и фибрилл, рыхло расположенных и окруженных гликоконъюгатным гелем — интегративно-буферной метаболической средой, которая является микроокружением всех клеточных элементов и, прежде всего, клеток крови.

При помещении клеток костного мозга в культуральную среду ССТК, обладая адгезивными свойствами, прикрепляются к дну культурального флакона. По морфологическим признакам выделены четыре группы клеток: «розетки»/«рокетки», палочковидные, дендритные, фибробластоподобные [1] (рис. 2). Среди них только одна группа (около 15%) обладала колониеобразующей пролиферативной активностью, что позволяло клеткам этой группы образовать сплошной монослой, в котором эти клетки имели преобладающее большинство, так как оставшиеся три группы клеток не пролиферировали.

Адгезивные клетки других вышеуказанных разновидностей соединительной ткани были более однородны, как по структуре, так и пролиферативной активности.

Выделенные из жировой ткани адгезивные ССТК после распластывания приобретали вид типичных фибробластов, содержащих в цитоплазме мелкие капельки жира. Иногда среди них встречались клетки с более крупными каплями жира и их скоплениями. После каждого деления размер и количество капель в дочерних клетках уменьшался. Размер самих клеток после деления восстанавливался до исходных. После трех пассажей почти все клетки сплошного монослоя имели вид типичных фибробластов.

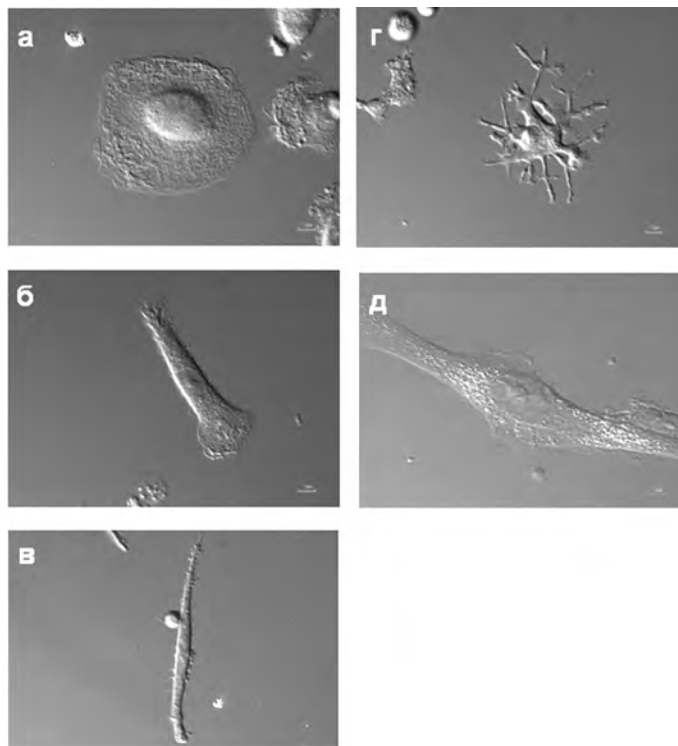


Рисунок 2. Типы адгезивных клеток костного мозга: а — клетка «розетка»; б — клетка «рокетка»; в — палочковидная клетка; г — дендритная клетка; д — фибробластоподобная клетка. СМ. Дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому, x900.

Большая часть адгезивных клеток, выделенных из суставного хряща, являлись хондроцитами [2]. Они несколько отличались по форме от вышепредставленных фибробластов. При этом следует отметить, что небольшая часть клеток по форме соответствовала типичным фибробластам. Это, очевидно, связано с тем, что в поверхностном слое суставного хряща находятся фибробласты, так как они синтезируют I тип коллагенового белка, из которого построены коллагеновые фибриллы, образующие этот слой. Эти фибробласты называют хондроцитами I морфотипа.

Самый тонкий поверхностный слой суставного хряща, содержащий хондроциты I морфотипа, находится в нагружаемых частях суставной поверхности. По мере удаления от этих участков, т.е. перехода хряща в структуру синовиальной оболочки, поверхностный слой становится толще. Такую особенность строения хряща следует учитывать при заборе материала для аутотрансплантации.

В первичном сплошном монослое структура у ССТК всех разновидностей соединительной ткани отличалась от структуры таких же ССТК, находящихся в составе тканей. Клетки частично регенерировали, т.е. восстанавливали свою структуру после обводнения. Однако, исходную тканевую структуру эти клетки не приобретали, хотя синтез компонентов ММ (коллагена и гликоконъюгатов) осуществляли.

При расщеплении первичного сплошного монослоя ССТК, помещенные в новую культуральную среду, также приобретали округлую форму, но отличались от клеток первичного пассажа несколько большими размерами и многочисленными выбуханиями цитоплазмы разного размера. Часть выбуханий были заполнены структурами цитоплазмы, в другой части выбуханий органеллы отсутствовали. Клетки этого первого пассажа были в большей степени обводнены, чем клетки первичного пассажа.

Очевидно, что при пассировании ССТК многократное действие неблагоприятных факторов (см. выше) в условиях, не соответствующих тканевым, вело к утрате у них характерного органнотопографического морфологического типа, при этом сохраняются дифференцировочные антигены (CD), свидетельствующие о принадлежности к ССТК.

Все ССТК вышеуказанных разновидностей соединительных

тканей применяются в клинической практике.

Аллогенные дермальные культивируемые фибробласты наносят на резорбируемые пленки для закрытия ожоговых поврежденных кожи, однако органоспецифичной тканевой структуры (дермы), также, как и новых кожных придатков, на месте трансплантации не образуется [3]. Все заканчивается формированием атипичного регенерата кожи — рубца.

Несмотря на отсутствие до сих пор законодательной базы, культивируемые аутофибробласты применяются в РФ как омолаживающая процедура для кожи лица на основании ранее проведенной Росздравнадзором РФ регистрации медицинской технологии [4].

Еще одной областью применения ССТК является ортопедия и травматология. Это восстановление поврежденных суставных хрящей и костей.

Для восстановления суставных хрящей используются культивируемые аутологичные хондроциты: в свободном виде под покрытием (надкостница, коллагеновые мембраны и др.) хрящевого дефекта [5]; в составе геля (коллагенового, гликоконъюгатного, фибринового); в форме сфероидов [6] или конструкторов [7].

Общим для всех вариантов применения аутологичных культивированных хондроцитов является формирование после трансплантации в хрящевом дефекте фиброзно-гиалинового соединительнотканного регенерата, структурно отличающегося от нативного хряща. Однако, наличие даже такого регенерата в дефекте предотвращает дальнейшее разрушение хряща, частично выполняет демпферную функцию и частично восстанавливает congruentность суставных поверхностей. Все это, в свою очередь, снижает или устраняет болевые ощущения. Следовательно, клиническая выраженность последствий повреждения суставного хряща существенно уменьшается.

Еще одной областью применения культивированных аутологичных ССТК является стимуляция или оптимизация репаративного остеогенеза. В данном случае используются ССТК стромы костного мозга, в которой присутствуют три дифферона ССТК: фибробластический, липоцитарный и остеохондральный. Последний представлен только клетками-предшественниками.

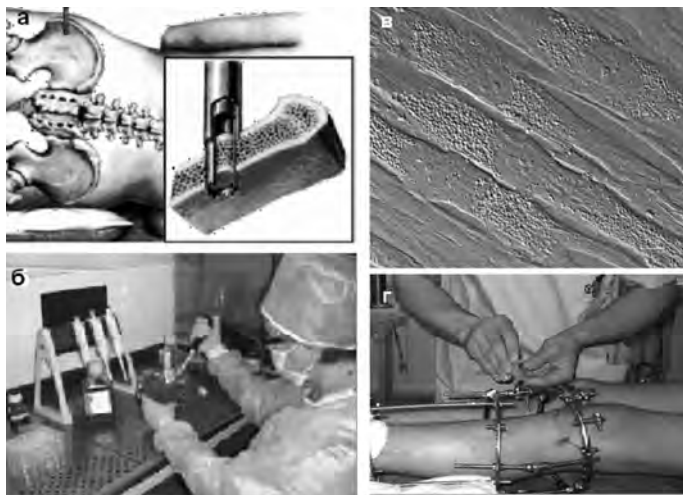


Рисунок 3. Культивирование и подготовка аутологичных ССТК к инъекции в замедленно формирующийся distractionный регенерат. а – трепан-биопсия крыла подвздошной кости. б – культивирование ССТК костного мозга. в – культура ССТК костного мозга на стадии конфлюэнтного монослоя. Дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому, x900. г – инъекция культивированных ССТК костного мозга в замедленно формирующийся distractionный регенерат.

Размноженные ССТК костного мозга могут быть использованы для стимуляции репаративного остеогенеза на различных матрицах и в виде инъекций. В наших работах [8] культивированные аутологичные стромальные ССТК трансплантировались путем инъекций в замедленно формирующиеся distractionные регенераты (рис. 3). Это приводило к значительному сокращению сроков (30–50%) восстановления полноценной опорной способности опери-

рованной конечности при distractionном остеосинтезе (рис. 4). При традиционном ведении таких пациентов, наряду с возможным замедленным «созреванием» distractionных регенератов, существует возможность того, что регенерат вообще не оссифицируется. Такой регенерат построен из плотной оформленной волокнистой соединительной ткани, внутри которой встречаются немногочисленные кристаллы гидроксиапатита. В этом случае необходима повторная операция для иссечения волокнистого регенерата, и установка на его место имплантата из деминерализованного костного матрикса или трансплантация аутологичной кости.

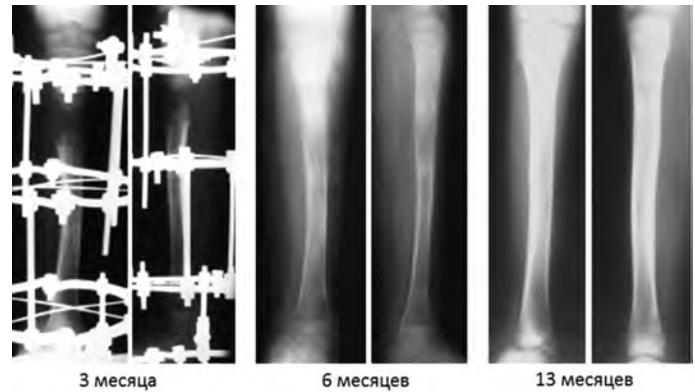


Рисунок 4. Рентгенограммы на различных сроках от начала клеточной терапии у пациентки Б. 6-ти лет с неравенством длины нижних конечностей, демонстрирующие эффект инъекций аутологичных ССТК в замедленно формирующийся distractionный регенерат.

Еще одной патологией, при которой есть необходимость применения клеточной терапии, является врожденный ложный сустав. У части детей с этой патологией после трех неудачных операций, как правило, конечность ампутуют. Клеточная терапия оказалась самым эффективным методом лечения в комплексе с оперативным вмешательством [9]. Был разработан новый метод лечения, при котором инъекции аутологичных ССТК в зону резекции ложного сустава привели к формированию полноценного костного регенерата между костными отломками. Последующий distractionный остеосинтез, в сочетании с трансплантацией ССТК на некотором расстоянии от вновь образованного костного регенерата, восстановил равенство длины обеих конечностей.

Таким образом, применение клеточных технологий с использованием ССТК является перспективным методом лечения различных патологических состояний, связанных с повреждением соединительной ткани или нарушением ее регенерации. Исследование динамики культивирования ССТК, а также их поведение в модельных экспериментах после имплантации в ткани (особенно при репаративной регенерации) необходимо для понимания механизмов участия этой клеточной популяции в репаративном процессе.

Это, в свою очередь, расширит область их эффективного применения в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Структурная динамика адгезивных клеток костного мозга при культивировании: первичный пассаж (часть 1) / Н.П. Омеляненко, В.К. Ильина, А.В. Ковалев и др // КТТИ. - 2012. - VII (4) - С. 28-37.
2. Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И.; под ред. С. П. Миронова Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). в 2 т. - М.: Известия, 2008. - Т. 2. - 600 с.
3. Туманов В.П., Жакота Д.А., Корчагина Н.С. 30-летний опыт разработки и применения клеточных технологий в клинической практике // Пластическая хирургия и косметология - 2012 - (3) - С. 353-528.
4. Применение аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи лица. Результаты годичных исследований. А. Зорина, В. Зорин, В. Черкасов и др. // Эстетическая Медицина - 2012 - IX (2) - С. 171-182.

5. Gille J1, Behrens P, Volpi P, de Girolamo L, Reiss E, Zoch W, Anders S. Outcome of Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC) in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry. Arch Orthop Trauma Surg. 2013 Jan; 133(1):87-93.

6. Libera J, Luethi U, Alasevic OJ Autologous matrix-induced engineered cartilage transplantation. In: Zanasi S, Brittberg M, Marcacci M: Basic Science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: current status and prospects. Volume 1, p.591-600, Italy, 2006.

7. Пономарев И.В., Кочнева М.Л., Barnewitz D. Влияние условий культивирования хондроцитов в трехмерном состоянии на формирование внеклеточного матрикса в тканеинженерных хрящевых конструктах. // Клеточные технологии в биологии и медицине - 2013 - № 4. - С. 197-205.

8. Влияние культивированных аутогенных соединительнотканых (стромальных) клеток костного мозга (СККМ) на замедленно формирующиеся дистракционные регенераты у детей. С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, О.В. Кожевников и др // КТТИ - VI (2) - 2011 - С.104-112.

9. Возможности клеточных технологий при лечении врожденных ложных суставов костей голени у детей. С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, О.В. Кожевников и др. // КТТИ - VII (2) - 2012 - С. 38-39.

Авторская справка

Омеляненко Николай Петрович

д.м.н., проф., руководитель лаборатории соединительной ткани

Ильина Валентина Клементьевна

к.м.н. старший научный сотрудник. Лаборатория соединительной ткани

Ковалев Алексей Вячеславович

к.м.н., старший научный сотрудник. Лаборатория соединительной ткани

Родионов Сергей Александрович

врач клинической лабораторной диагностики. Клинико-диагностическая лаборатория с отделением переливания крови

Иванов Алексей Валерьевич

к.м.н., врач травматолог-ортопед, ведущий научный сотрудник. Отделение детской ортопедии

Хлыстова Анна Викторовна

врач травматолог-ортопед. Детская поликлиника

ФГБУ «ЦИТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России

Российская Федерация, г. Москва 127299 ул. Приорова, 10

omel156@yandex.ru

*Omelyanenko N.P., Ilyina V.K., Kovalev A.V.,
Rodionov S.A., Ivanov A.V., Khlystova A.V.*

THE POSSIBILITY OF USING PROPER CONNECTIVE TISSUE CELLS (PCTC) IN INJURED CONNECTIVE TISSUE RESTORATION

Priorov Central Institute of Traumatology and Orthopaedics,
Moscow, Russian Federation

Abstract. Nowadays, the cultures of proper connective tissue cells (PCTC) derived from different localization sources are widely used in regenerative medicine. Study of the behavior of PCTC during their cultivation as well as affect of different factors that accompany this process will facilitate the understanding of the mechanism of their therapeutic action and thus extend the scope of cell therapy. It is shown that PCTC of different types of connective tissue repeatedly changed their shape and relative position after the isolation from the tissue, during cultivation, passaging and cryopreservation. Significant changes were occurred in the structural elements of the cells. That changes were logical and present in PCTC, derived from all types of connective tissue. The obtained results allowed to successfully use of PCTC in the experimental animals models of damaged bones and articular cartilage restoration and in the patient's reparative osteogenesis optimization at tensio-compression osteosynthesis.

Keywords: proper connective tissue cells (PCTC), cell cultivation, regenerative medicine, cell therapy, osteosynthesis

REFERENCES

1. Structural dynamics of adhesive bone marrow cells by cultivation: primary passage (part 1). N.P. Omelianenko, V.K. Ilyina, A.V. Kovalev., V.A. Kalsin., S.A. Rodionov. CTTI. - 2012. - VII (4) - P. 28-37.

2. Connective Tissue – Histophysiology, Biochemistry, Molecular Biology. N.P. Omelyanenko, L.I. Slutsky, S.P. Mironov. CRC Press - 2013 - 638p.

3. 30 years of experience in the development and application of cellular technologies in clinical practice. Tumanov V.P., Jacotot D.A., Korzhagin N.S. Plastic surgery and cosmetology - 2012 - (3) - С. 353-528.

4. The use of autologous dermal fibroblasts in correction of age-related changes of the skin. The results of annual research. A. Zorin, V. Zorin, V. Cherkasov et al. Aesthetic Medicine - 2012 - IX (2) - С. 171-182.

5. Gille J1, Behrens P, Volpi P, de Girolamo L, Reiss E, Zoch W, Anders S. Outcome of Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC) in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry. Arch Orthop Trauma Surg. 2013 Jan; 133(1):87-93.

6. Libera J, Luethi U, Alasevic OJ Autologous matrix-induced engineered cartilage transplantation. In: Zanasi S, Brittberg M, Marcacci M: Basic Science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: current status and prospects. Volume 1, p.591-600, Italy, 2006.

7. Ponomarev IV, Kochneva ML, Bernewitz D. The influence of conditions of the cultivation of chondrocytes in a three-dimensional state of the formation of the extracellular matrix in cartilage tissue-engineering constructs. Cell techniques in biology and medicine - 2013 - № 4. - С. 197-205.

8. The effect of cultured autologous connective (stromal) bone marrow cells (BMSC) at slow forming distraction regenerate in children. S.P. Mironov, N.P. Omelyanenko, O.V. Kozhevnikov et al. KTTI- VI (2) - 2011 - С.104-112.

9. The possibility of cellular technology in the treatment of congenital pseudarthrosis of leg bones in children. S.P. Mironov, N.P. Omelyanenko, O.V. Kozhevnikov et al. KTTI - VII (2) - 2012 - С. 38-39.

Authors

Omelyanenko Nikolai P.

MD, Ph.D, D.Sc, Prof., Head of the laboratory, Laboratory of connective tissue

Ilyina Valentina K.

MD, Ph.D, Senior Researcher. Laboratory of connective tissue

Kovalev Aleksey V.

MD, Ph.D., Senior Researcher. Laboratory of connective tissue

Rodionov Sergey A.

MD, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Clinical Diagnostic Laboratory with the Department of Blood Transfusion

Aleksei Valer'evich I.

MD, Ph.D, Doctor Traumatologist - Orthopedist, Leading Researcher. Department of Pediatric Orthopedics

Khlystova Anna V.

MD, Doctor Traumatologist - Orthopedist. Child clinic

Priorov Central Institute of Traumatology and Orthopaedics,

127299, Priorov str. 10 Moscow, Russian Federation

omel156@yandex.ru