

ЭТАПЫ ГИСТОГЕНЕЗА ОСТЕОГЕННОГО ТРАНСПЛАНТАТА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ И РЕЦИПИЕНТНОМ ЛОЖЕ

© 2019 г. А. М. Зайдман^{1, *}, И. А. Шевченко², Е. Л. Строкова¹, А. Ф. Гусев^{1, 3}, Н. Ю. Пахомова¹,
И. А. Кирилова¹, В. В. Рерих^{1, 3}, В. М. Субботин⁴

¹Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
им. Я.Л. Цивьяна, Новосибирск, 630091 Россия

²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

³Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, 630091 Россия

⁴Arrowhead Pharmaceuticals, Madison WI, and University of Pittsburgh, Pittsburgh PA, USA

*E-mail: AZaydman@niito.ru

Поступила в редакцию 05.12.2018 г.

После доработки 15.02.2019 г.

Принята к публикации 26.02.2019 г.

В статье представлены стадии остеогенной дифференцировки хондрогенного трансплантата в культуральной среде и в реципиентном ложе (дефекте костной ткани). В культуральной среде в хондротрансплантате происходят преобразования клеток и матрикса, формирование сосудистых полостей с эндотелиальной выстилкой, образование матричных везикул в остеобластах (первая стадия минерализации). Экспрессия генов и детекция белков хондрогенного типа сменяется экспрессией генов и белков остеогенной стадии дифференцировки. Дальнейшие этапы гистогенеза костной ткани происходят в реципиентном ложе. Через сформированные анастомозы сосудов остеотрансплантата и реципиента поступают гуморальные факторы регуляции и пластические вещества, на основе которых завершается процесс формирования органоспецифического регенерата с полной интеграцией в организм реципиента. Результаты исследования являются основанием для дальнейшего применения остеогенного трансплантата в клинической практике.

Ключевые слова: остеотрансплантат, хондротрансплантат, экспрессия генов, кальцификаты, матричные везикулы, интеграция, остеогенез, регенерация

DOI: 10.1134/S0041377119050080

Костная система в процессе эволюции развилась в качестве опорной структуры в составе внутреннего скелета. С усложнением организмов функции костной системы значительно расширились. Прежде всего, это необходимый компонент нормального развития клеток костного мозга, который является источником обновления всей системы внутренней среды млекопитающих (Заварзин, 1976; Deckers et al., 2002). Размножение и дифференцировка стволовых клеток в направлении образования кроветворных клеток и форменных элементов крови требуют тесного контакта с костью, находящейся в состоянии активного остеогенеза (Фриденштейн, Лурия, 1980; Street et al., 2002). Это подтверждается и при образовании эктопической костной ткани, в которой неизменно формируется миелоидный костный мозг и возникает новый костномозговой орган. Участие в гистогенезе кроветворной ткани — важная функция костной ткани (Dai, Rabie, 2007; Claes et al., 2012).

Костная ткань представляет собой депо минерального обмена. Костные кристаллы (кристаллы гидроксиапатита) у человека с массой тела 70 кг со-

держат 1200 г кальция, суммарная поверхность костных кристаллов составляет 400000 м² и создает обширный плацдарм для обмена ионов. Для нормального уровня ионов кальция (Ca²⁺) в крови этого бывает недостаточно, тогда мобилизуются запасы Ca²⁺, заключенные во внутренних участках костных кристаллов (Фриденштейн, Чертков, 1969).

Скелет (кость) — не только депо минеральных солей, но и буферная система, участвующая в поддержании концентрации ионов Ca²⁺. Одна из функций костной ткани — непрерывное поддержание костеобразовательного процесса. Это значит, что кость в течение всего онтогенеза является постоянно обновляющейся системой, которая обеспечивает образование костной (опорной) и гемопоэтической тканей в нужном количестве (Фриденштейн, Чертков, 1969).

Естественно, что повреждение костной ткани, дефекты, оперативные вмешательства не могут не отражаться как на опорной функции, так и на обменных процессах организма, поэтому восстановление дефектов или заместительная терапия при утра-

те костной ткани являются важнейшей проблемой восстановительной медицины.

Каким должен быть процесс восстановления костной ткани? Можно ли сконструировать межпозвонокковый диск, тело позвонка, пяточную, большеберцовую кости и создать банк запасных частей опорно-двигательного аппарата? Можно ли создать из аутологических клеток подобные трансплантаты – органы? Возможно, что разум человека в сочетании с техническим прогрессом создаст подобные трансплантаты, но в настоящее время это невозможно. Почему? Слишком сложным является строение и взаимоотношение тканей, входящих в состав, например, межпозвоноккового диска с его тончайшими канальцами, через которые совершаются обменные процессы со сложным метаболизмом и регуляцией на общеорганизменном уровне (Зайдман, Бородин, 2015).

XX в. – это век перехода от “металломании” к клеточным технологиям, перспективы которых сулят создание совершенных биологических пластических материалов на основе передовых технологий (Kaneshiro et al., 2007; Gong et al., 2011; Bose et al., 2012; Samavedi et al., 2013; Takahashi, Yamanaka, 2013; Дергилев и др., 2016; Kaijiyama, 2016). Именно биологические конструкции способны восстановить не только структурно-функциональную, но и гомеостатическую целостность костной ткани. В Новосибирском НИИТО разработка биологических клеточных технологий проводится в течение многих лет. Успешно апробированы в эксперименте культивированные хондробласты для регенерации дефектов костной ткани (Зайдман и др., 2013), пластинки роста (Зайдман и др., 2010) и пульпозного ядра межпозвоноккового диска (Зайдман и др., 2012). На основе культивированных хондробластов разработан хондротрансплантат, который идентифицирован на молекулярно-генетическом уровне и успешно применен в эксперименте в качестве пластического материала. Полученные результаты явились основой для создания в культуральной среде остеотрансплантата, способного путем первичного остеогенеза в короткие сроки формировать регенерат на основе полной интеграции с ложем реципиента и встраиваться в гомеостатическую систему организма реципиента.

Цель настоящей работы – исследование закономерностей остеогенеза в процессе создания остеогенного трансплантата для пластического замещения дефектов костной ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты. Исследование выполнено на мини-свиньях с соблюдением положений Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации и Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (утв. Приказом Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 19.03.2003 г. № 226). Разрешение на проведение работ

было получено на заседании Локального Этического Комитета ФГБУ “ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна” Минздрава России (протокол заседания № 019/15 от 28 декабря 2015 г.). Основой для создания остеотрансплантатов служили хондротрансплантаты, изготовленные из культивированных хондробластов, полученных из позвоночника новорожденного мини-поросенка. Выделение клеток из ткани, культивирование хондробластов, формирование хондротрансплантата осуществляли согласно методикам, указанным в соответствующих патентах (Корель и др., 2006; Зайдман и др. 2010).

Направленную остеогенную дифференцировку производили на основе хондротрансплантата при помощи остеоиндуктивной среды на основе среды RPMI-1640, содержащей 15% фетальной бычьей сыворотки, смесь стрептомицина с пенициллином и амфотерицин В. В качестве индукторов остеогенной дифференцировки клеток применяли 10 мМ/л β-глицерофосфата, 100 нМ/л дексаметазона и 0.2 мМ/л аскорбиновой кислоты. Трехмерный остеотрансплантат получали по протоколу, описанному в патенте (Зайдман и др. 2016).

Пересадку остеотрансплантатов осуществляли на 15 мини-свиньях (возраст 6 мес.). В качестве контроля (10 животных того же возраста) использовали аутогенный трансплантат. В качестве аутогенного трансплантата была использована костная ткань при формировании дефекта тела позвонка экспериментального животного. Под общим наркозом выполняли передний забрюшинный доступ к телам поясничных позвонков. При помощи бора формировали в вентральном отделе тела позвонка костный дефект с размером в глубину и ширину, соответствующем размеру трансплантата (около 5 мм). Сформированный дефект полностью заполняли остеотрансплантатом. В сформированный дефект укладывали трехмерный остеотрансплантат и аутогенный трансплантат с плотным прилеганием к реципиентному ложу. Животных выводили из эксперимента через 7 и 14 сут и 1, 2, 3 мес. Фиксацию, проводку материалов и изготовление морфологических препаратов проводили по традиционной методике. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином. Для ультраструктурного анализа клеток и матрикса хондротрансплантаты и остеотрансплантаты фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида с дефиксацией раствором осмия, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в эпон-аралдит. На ультратоме Leica (Германия) готовили ультратонкие срезы, контрастировали уранил ацетатом и изучали под электронным микроскопом Hitachi-600 (Япония).

Выделение РНК и полуколичественная Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. РНК из клеток и трансплантатов выделяли с помощью TRIzol Reagent (Sigma, США). Синтез кДНК проводили обратной транскриптазой MMLV (Promega, США). Относительный уровень экспрессии генов определяли с помощью полуколичественной ПЦР в режиме реального времени, используя реакционную

Таблица 1. Список олигонуклеотидов для полуколичественного ПЦР в режиме реального времени

Гены	Олигонуклеотиды	Размер продукта	Температура отжига, °C
Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase <i>Gapdh</i>	F1: aactcactcttctacctttg R1: caaattcattgtcgtaccag	90	58.0
Alkaline phosphatase <i>Alp</i>	ALP-F ATGAGCTCAACCGGAACAA ALP-R GTGCCCATGGTCAATCCT	131	56.0
<i>Osteonectin</i> <i>On</i>	ON-F TCCGGATCTTTCCITTGCTTTCTA ON-R CCTTCACATCGTGGCAAGAGTTTG	187	57.0
Bone sialoprotein <i>Bsp</i>	BSP-F GCACGCCTACTTCTATCCTC BSP-R CGGCCTCGGAGTCTT	185	59.0
Osteopontin <i>Opn</i>	OPN-F actccgatgaatccgatgag OPN-R tccgtctctcactttccac	220	58.0
<i>Runt-related transcription factor 2</i> <i>Runx2</i>	RUNX2_F CTCATTCCCTGG CTCAC RUNX2_R TGGGCAGACAGTCAGAAGAG	80	63.0
Transforming growth factor beta <i>Tgfb</i>	F ACCTGACTGGGGTCTTCCTT R AGTTCCCAGGCTAGGGGTTA	458	56.0
Collagen type 2 <i>Col2</i>	COL2-F CTGGAGCTCCTGGCCTCGTG COL2-R CAGATGCGCCTTTGGGACCAT	138	65.0
Sex determining region Y-box 9 <i>Sox9</i>	SOX9-F CCGGTGCGCGTCAAC SOX9-R TGCAGGTGCGGGTACTGAT	119	57.0
Aggrecan <i>Acan</i>	ACAN-F2 TTCCCTGAGGCCGAGAAC ACAN-R2 GGGCGGTAATGGAACACAAC	194	65.0
Decorin <i>Den</i>	DEC-F CCATGAGAATGAGATCACCAA DEC-R CTTGAGGGATGGTGGTAATGTT	182	60.0
Biglycan <i>Bgn</i>	BG-FCTACCTGCACACCAACAACATC BG-RFCGGCTGCCTCTACTTTTGTGTA	202	60.0
Lumican <i>Lum</i>	LUM-F ATCCCCACAATGACATAACTCC LUM-RTGCACTATGGACAAGAATCCAC	153	60.0
Collagen type 1 <i>Col1</i>	COL1F CCAAGAGGAGGGCCAAGAAGAAGG COL1R GGGGCAGACGGGGCAGCACTC	232	60.0

смесь с интеркалирующим красителем SYBR Green I (M-427; Синтол, Россия) на приборе LightCycler 480 II (Roche, Швейцария). Уровень экспрессии целевых генов относительно гена домашнего хозяйства *Gapdh* рассчитывался методом 2^{-ddCt} , затем полученные значения нормировали на значение уровня экспрессии гена *Col2* (коллагена I типа) в хондробластах. Последовательности олигонуклеотидов, размер ПЦР-продуктов и температура отжига приведены в табл. 1.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Использовали антитела к коллагену 1 в разведении 1 : 200 (ab34710), коллагену 2 в разведении 1 : 100 (ab3092), агрекану в разведении 1 : 100 (ab3778-1), фибронектину в разведении 1 : 200 (ab6328), фактору фон Виллебранда в разведении 1 : 100 (ab6994) (Abcam, Великобритания), поверхностному антигену CD44 в разведении 1 : 100 (14-0441-82; eBioscience, США) и остеонектину в разведении 1 : 50 (NCL-O-NECTIN,

Leica Biosystems, Германия). Детекцию антител осуществляли с помощью флуоресцентно меченных конъюгатов Alexa Fluor®568 и AlexaFluor®488 с антителами к иммуноглобулинам кролика или мыши. Кроме того, для выявления эндотелиальных клеток использовали флуоресцентно меченый Alexa Fluor®594 изолектин B4, (I21413, Termo Fisher Scientific, США) в разведении 1 : 75. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Nikon Ti-E (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурная характеристика хондротрансплантата. Хондротрансплантат представлен клетками хондрогенного ряда, расположенными в гомогенном альциан- и Хейл-позитивном матриксе (рис. 1a). В центральных отделах хондротрансплантата встречаются гипертрофические хондроциты с крупным яд-

ром и вакуолизированной цитоплазмой. На периферии — это дифференцированные хондробласты с центрально расположенным ядром, 1–2-мя ядрышками и гетерохроматином. В цитоплазме этих клеток — широкая эндоплазматическая сеть с прикрепленными и свободными рибосомами, а также диффузно расположенным комплексом Гольджи. Митохондрии круглые с хорошо контурирующими кристами. В хондробластах экспрессируются гены коллагена II типа (*Col2*), агрекана (*Acan*), бигликана (*Bgn*), люмикана (*Lum*) и *SOX9* (рис. 1д). В цитоплазме детектируются белки, соответствующие хондрогенной дифференцировке (рис. 1б–1е).

Трансформация хондротрансплантата в остеогенной среде проходила ряд последовательных стадий, каждая из которых имеет функциональные, морфологические и молекулярно-генетические особенности.

Стадия синтеза остеоида. Через 7–10 сут поверхность хондротрансплантата, помещенного в остеогенную среду, окружена клетками вытянутой формы с ацентрично расположенным ядром и узкой цитоплазмой. Клетки тесно прилегают друг к другу, формируя структуру, напоминающую оболочку (рис. 2а). Возможно, этот слой выполняет барьерную функцию подобно тому, как это происходит в эмбриогенезе на этапе хондро-остеогенеза. Вокруг хрящевого “макета” путем уплотнения мезенхимных клеток формируется “оболочка”, которая трансформируется в надкостницу — источник остео-вазулогенеза в процессе остеогенной дифференцировки хряща (Хэм, Кормак, 1983). Под этим слоем располагаются клетки преимущественно полигональной формы, в цитоплазме и в матриксе которых определяются эозинофильные включения, иммуногистохимически идентифицированные как сиалопротеины (рис. 2б).

В центре трансплантата эозинофильные включения исчезают; матрикс становится гомогенным, приобретает бледно базофильную окраску. В клетках этих зон выявляются гранулы щелочной фосфатазы (рис. 2в); детектируется коллаген I типа (рис. 2г) и остеоонектин, что является основанием для определения этих клеток как преостеобласты и остеобласты I–II степени (Омельяненко, Слуцкий, 2010). Часть клеток находится в апоптозе, в результате чего в матриксе образуются полости, ограниченные лишь тонким слоем базофильного матрикса (рис. 2а). Надо полагать, что подобные полости — это отражение гистогенеза в эмбриогенезе — предшествующий этап формирования сосудов. При формировании костной ткани из хряща также образуются полости путем апоптоза хондробластов, а затем на стадии остеогенеза эти полости выстилаются эндотелиальными клетками (Хэм, Кормак, 1983; Фриденштейн, Лурия, 1980).

Канальцевая система в эмбриогенезе формируется в матриксе хряща. В результате апоптоза хондробластов образуются бесклеточные участки, которые рез-

орбируются металлопротеиназами, синтезируемыми гипертрофическими хондроцитами (Комогі, 2008).

На стадии хондрогенной дифференцировки в эмбриогенезе (Хэм, Кормак, 1983; Фриденштейн, Чертков, 1969) и в дефинитивном хряще преобразованные полости выполняют функции обмена метаболитов. Это так называемая канальцевая система метаболизма (Зайдман, Бородин, 2015). В центральных зонах трансплантата наблюдаются остеоидные трабекулы и кальцификаты.

Известно, что преостеобласты и остеобласты интенсивно аккумулируют фосфор и кальций (Родинова, 1989) в данном варианте из культуральной среды. В этот период происходит соединение белков остеоонектина с коллагеном I типа и формированием остеоидных трабекул как этап остеогенеза остеотрансплантата (Омельяненко, Слуцкий, 2010). Есть основания полагать, что стадия гистогенеза остеотрансплантата повторяет ранние этапы формирования костной ткани в эмбриогенезе (Фриденштейн, Лурия, 1980).

Стадия формирования сосудов. Через 10–14 сут в хондротрансплантате, помещенном в остеогенную среду, происходят значительные изменения клеточного состава и матрикса. Основной фенотип клеток — это преостеобласты, остеобласты I и II типов, расположенные в матриксе, в котором выявляются сосудистые полости (рис. 3а), высланные клетками эндотелия, экспрессирующие фактор Виллебранда и изолектин В4 (рис. 3б). Матрикс базофильный, гомогенный, равномерно заселён клетками, в которых детектируется поверхностный антиген CD44, коллаген I типа, фибронектин, остеоонектин и остеоопонтин. В клетках экспрессируются гены щелочной фосфатазы (*Alp*), остеоонектина (*On*), остеоопонтина (*Opn*), сиалопротеина (*Bsp*), транскрипционного фактора *Runx2* (рис. 3в). Все это свидетельствует о том, что клетки хондротрансплантата вступили в стадию остеогенной дифференцировки (Родан, Родан, 2000). Критерием остеогенной дифференцировки трансплантата является переход от канальцевой системы метаболизма (микроциркуляции) к оксигенетической — сосудистой. Об этом свидетельствует формирование сосудистых полостей с эндотелиальной выстилкой.

Вместе с тем, вопрос о природе эндотелиальных клеток в остеотрансплантате остается открытым. Известно, что клеточные популяции механоцитов не содержат детерминированных сосудистых клеток-предшественников (Заварзин, 1976). По данным Фриденштейна и Лурии (1980) клеточные линии механоцитов образуют строму, на которой развиваются потомки стволовых кроветворных клеток. Костная ткань служит необходимым индуктором для дифференцировки кроветворной ткани. Интенсивность кроветворения зависит от стромального “плацдарма”, который определяется объемом костного вещества (Javassoli, Fridenstein, 1983). Костная

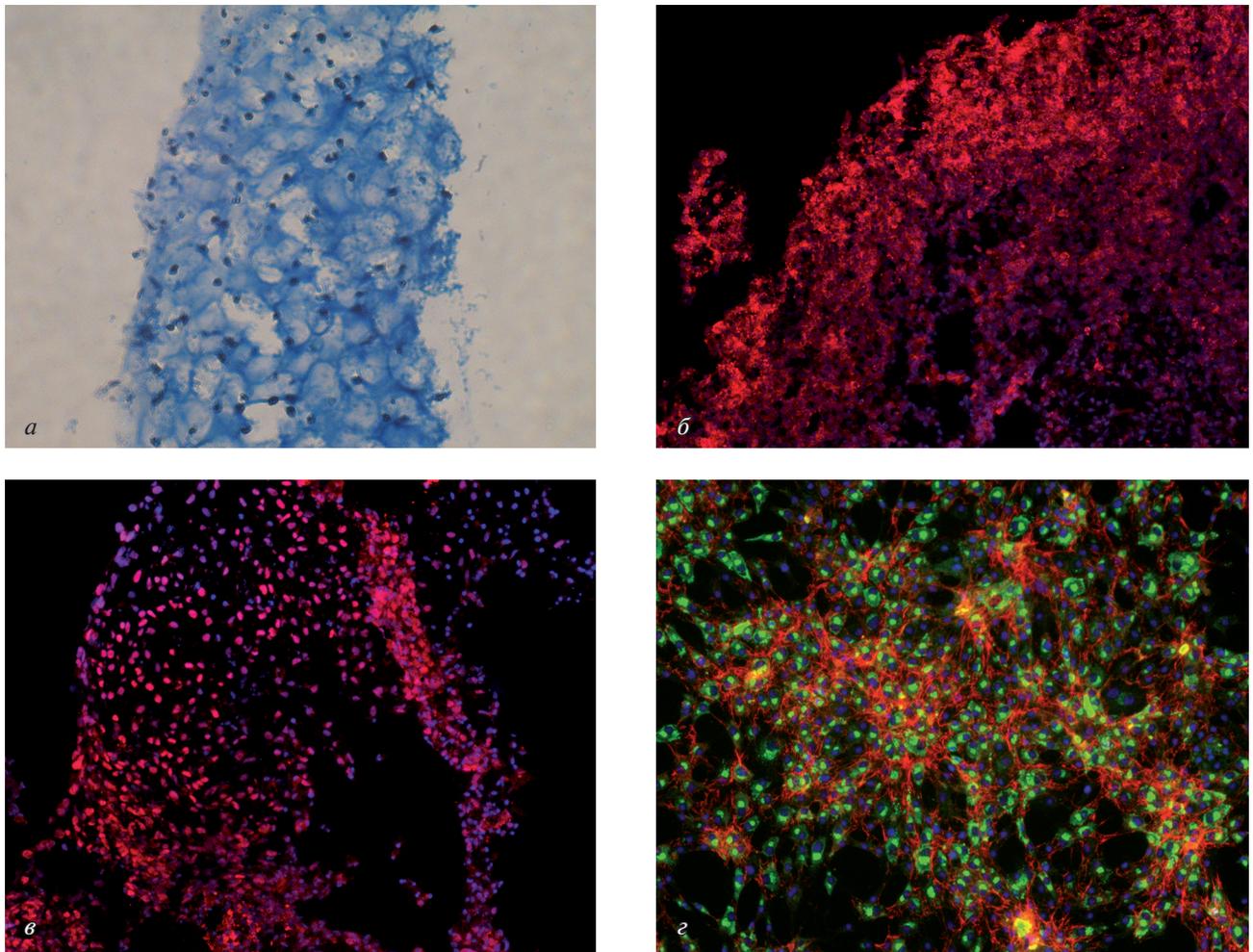


Рис. 1. Структурная характеристика хондротрансплантата (*a–e*) и относительный уровень экспрессии генов в хондротрансплантате (*d*). *a* – Окраска альциановым синим, *б, в, г* – иммуногистохимическая реакция на белки к агрекану, коллагену II типа и SOX9 соответственно. Об.: 20×. *д* – Уровень экспрессии генов в хондротрансплантате, ПЦР в режиме реального времени. Данные представлены средними значениями (\pm SD, вертикальные отрезки). Звездочка показывает достоверные различия уровня экспрессии гена агрекана (*Acan*) и генами коллагена II типа (*Col2*), бигликана (*Bgn*), люмикана (*Lum*) и *SOX9* ($P < 0.05$).

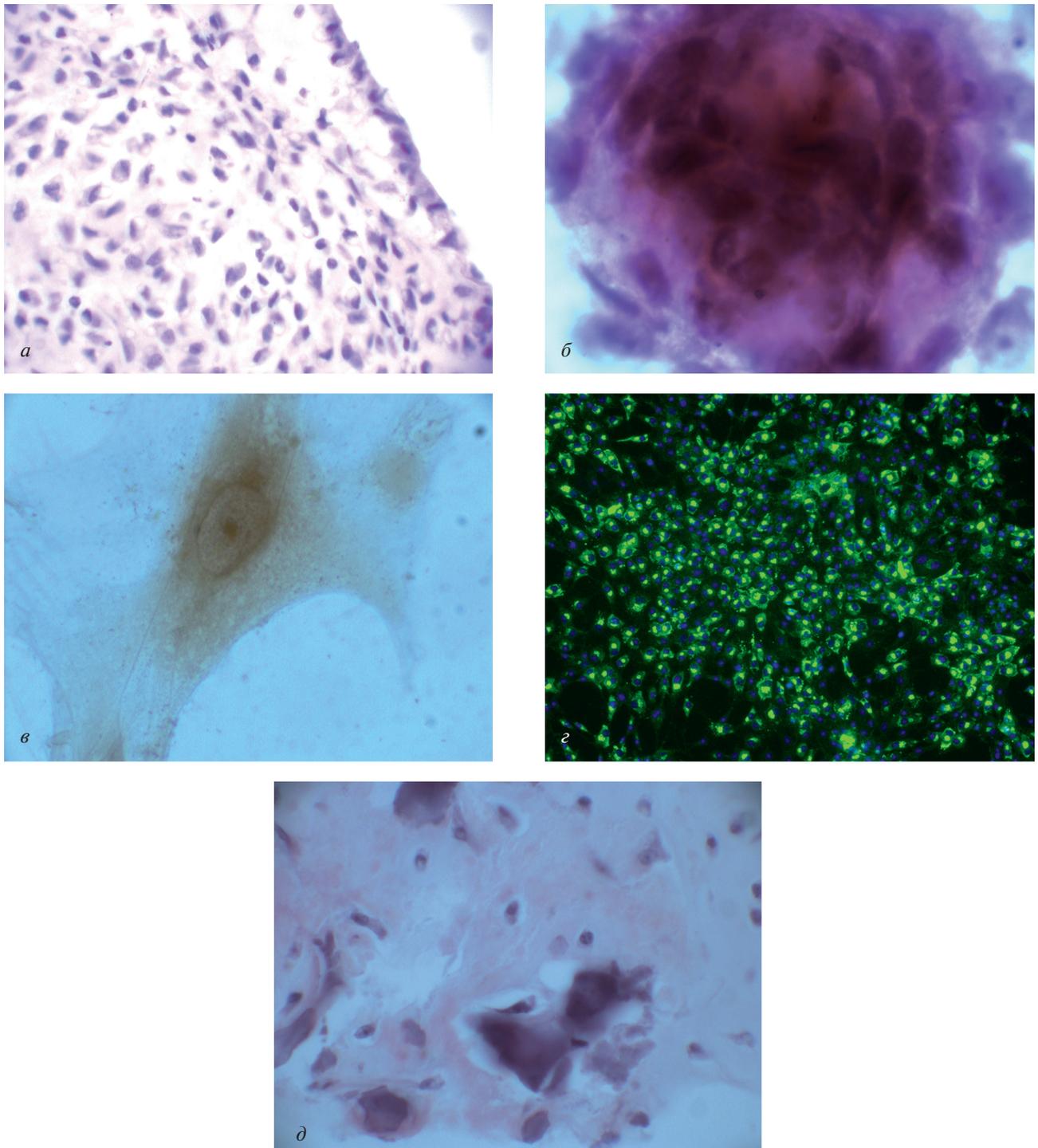


Рис. 2. Стадия синтеза остеоида. *а* – На поверхности остеотранспланта расположены клетки, формирующие оболочку. Окраска гематоксилин-эозином, об.: 20×. *б* – В цитоплазме клеток и матриксе выявляются белковые включения (остеонектин). Иммуногистохимическая реакция на белки к остеонектину, об.: 100×. *в* – Гранулы щелочной фосфатазы в остеобластах, об.: 100×. *г* – Иммуногистохимическая реакция на белки к коллагену I типа, об.: 20×. *д* – Кальцификаты и остеоидные trabекулы в центре остеотранспланта. Окраска гематоксилин-эозином, об.: 40×.

ткань как регулятор гомеостаза на организменном уровне появляется на самых ранних стадиях онтогенеза (Заварзин, 1976). На основе первичной костной

ткани формируется гемопоэтическая ткань. Можно предполагать, что этапы остеогенеза в культуре повторяют закрепившуюся детерминированность фор-

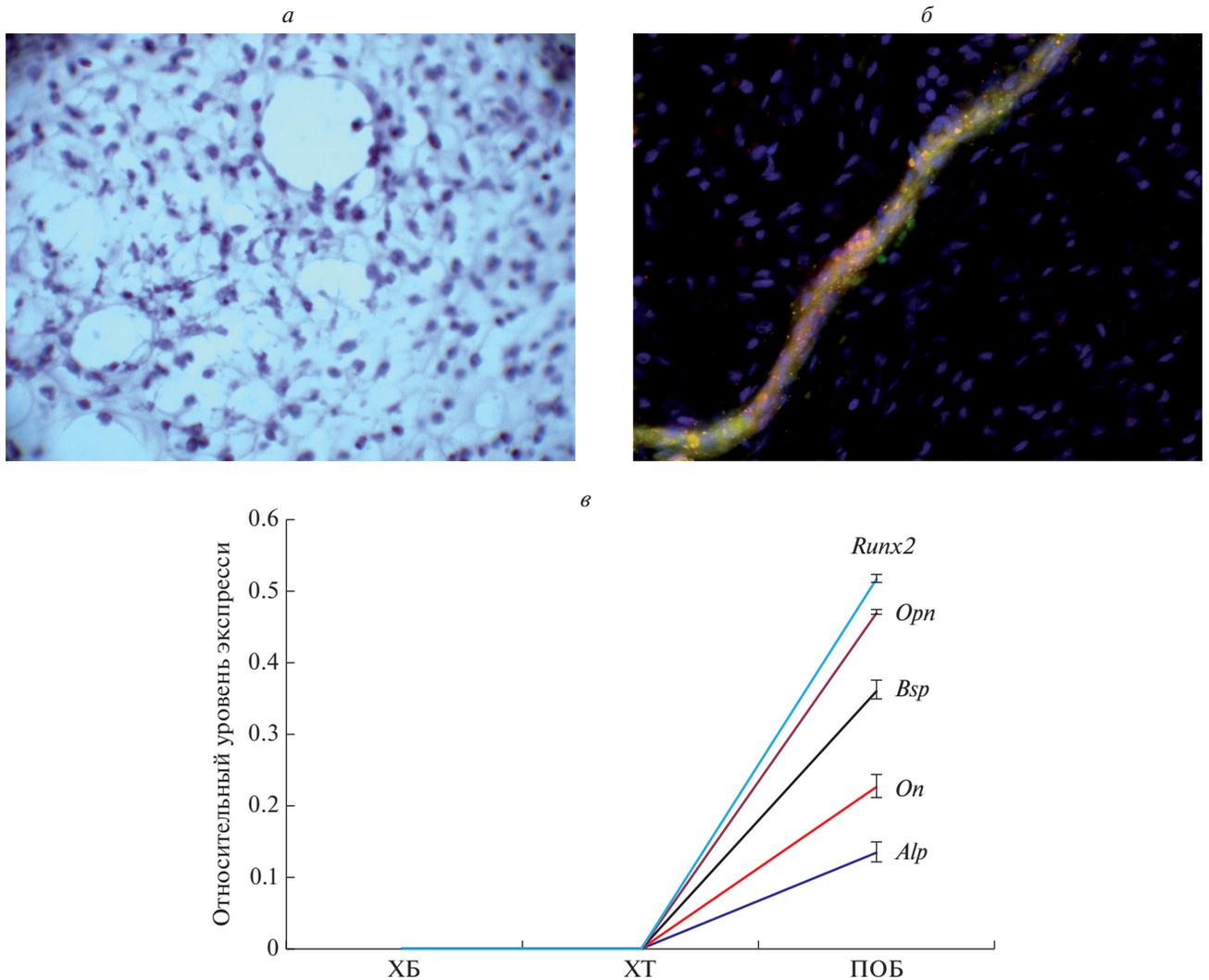


Рис. 3. Стадия формирования сосудов. *а* – Сосудистые полости, выстланные эндотелием; окраска гематоксилин-эозином, об.: 20×. *б* – Сосуд в остеотрансплантате; иммуногистохимическая реакция на белки к фактору Виллебранда и изолектину В4, об.: 20×. *в* – Относительный уровень экспрессии генов в преостеобластах; ПЦР в режиме реального времени: ХБ – хондробласты, ХТ – хондротрансплантат, ПОБ – преостеобласты. Данные представлены средними значениями (\pm SD, вертикальные отрезки).

мирования костной и сосудистой систем в эмбриогенезе. Наличие гипертрофических хондроцитов в центральных отделах остеотрансплантата является основанием для следующей трактовки природы эндотелиальных клеток. Известно (Maes et al., 2002), что гипертрофические хондроциты нарабатывают фактор роста сосудов. Есть данные, что гипертрофический хондроцит при делении уходит в апоптоз, а вторая клетка приобретает фенотип остеогенной (Roach et al., 1955; Kiyoto et al., 1966; Rodan et al., 1988; Maes et al., 2002; Nasharu et al., 2010). Далее под влиянием асимметричного деления происходит дифференцировка остеогенной клетки в остеобласт – эндотелиобласт. Подобной теории придерживается Гололобов с сотрудниками, называя эту клетку вы-

стилающей, предположительно эндотелиальной (Гололобов, Деев, 2003; Деев и др., 2004).

Возможно ли принять гипотезу о дифференцировке остеобласта в эндотелиальную клетку? Существует и другое объяснение: дифференцировка эндотелиальных клеток является результатом синтеза остеобластами ангиопоэтина и кадгерина – сигнальных молекул, индуцирующих дифференцировку или трансдифференцировку остеобласта в эндотелиоцит (Wang et al., 2007; Franceschi et al., 2009). Возможен и третий вариант: в процессе выделения хрящевых клеток в культуральную среду могли попасть и предшественники гемопоэтических клеток, которые в остеогенной среде активизировались. Этот вопрос является предметом дальнейших исследований. На-

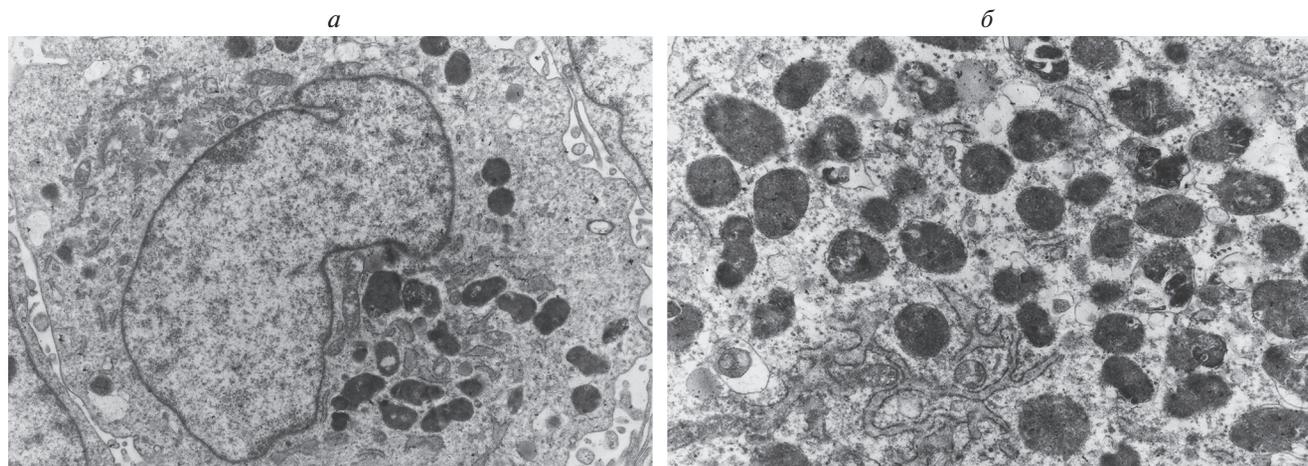


Рис. 4. Стадия минерализации. Матричные везикулы (*a, б*) в цитоплазме остеобластов IV степени. Электронная микроскопия, увел.: 1000× (*a*) и 5000× (*б*).

личие сосудов в остеотрансплантате является метаболической основой продолжения остеогенной дифференцировки клеток — вступления в стадию минерализации.

Стадия минерализации. Это следующая стадия формирования остеотрансплантата (14–30 сут культивирования). В этот период происходит процесс трансформации клеток и матрикса — становление остеотрансплантата как “примитивной” тканевой структуры. Клетки трансплантата находятся на разной стадии дифференцировки: от преостеобластов до остеобластов IV типа. Последние представляют собой клетки с крупным ядром и инвагинантами (рис. 4*a*). Ядро и органеллы оттеснены к мембране вакуолями, окруженными двухслойной мембраной со светлым ободком. Вакуоли в зависимости от степени зрелости заполнены гомогенным содержимым от светлой до темной окраски (ультраструктурные данные). Эти образования идентифицированы как матричные пузырьки (рис. 4*б*).

Что такое матричные пузырьки? Это структуры, формирующиеся на эндоплазматическом ретикулуме и комплексе Гольджи, содержащие пирофосфатазу, щелочную фосфатазу, неорганический пирофосфат (кальций и фосфор) (Фриденштейн, Лурия, 1980; Родионова, 1989; Омеляненко, Слуцкий, 2010). В матричных пузырьках происходит ферментное превращение аморфного пирофосфата в органический гидроксипатит, растворение, гидратация кристаллов и формирование центров минерализации. Матричные пузырьки образуются из белков цитоскелета в остеобластах III–IV степени и являются универсальным этапом минерализации (Anderson et al., 2005; Nishiguchi et al., 2010). Нанокристаллы минерализации в остеоиде при участии щелочной фосфатазы связываются с коллагеном I типа и располагаются в виде цепочек вдоль коллагенового волокна, и далее проис-

ходит процесс оссификации (Weismann et al, 2005). В культуральной среде стадия минерализации ограничивается формированием матричных пузырьков, отпочковыванием и выпадением их в матрикс.

Вторичный этап кристаллизации в культуральной среде в остеотрансплантате не происходит, так как для оппозиционного роста кристаллов требуется дополнительное количество кальция (Ca^{2+}) и фосфора (P) (Franz-Odenaal et al., 2006; Franceschi et al., 2009). Этот процесс совершается в реципиентном ложе при замещении дефекта костной ткани остеотрансплантатом.

Структурная характеристика остеогенного трансплантата. Остеогенный трансплантат на стадии 30 сут дифференцировки состоит из клеток остеогенного ряда — от преостеобластов до остеобластов I–IV типов. Цитоплазма последних заполнена матричными везикулами. Отпочкованные везикулы локализуются и в матриксе. Матрикс состоит из коллагена I типа, ПГ (фибронектин, бигликан, версикан, люмикан) и кальцификатов, расположенных вокруг сосудов с эндотелиальной выстилкой (рис. 5*a*). В клетках экспрессируются гены (рис. 5*б*): *Alp*, *On*, *Bsp*, *Opn*, *RUNK2* и соответствующие белки: антиген CD44, фибронектин, коллаген I типа и остеоонектин. В эндотелиоцитах выявляются фактор Виллебранда и изолектин В4. Характерные для хрящевой ткани (хондротрансплантата) гены и белки (*Sox9*, *Col2*, *Acan*) экспрессируются в остеотрансплантате в минимальных количествах. Следовательно, есть основание заключить, что процесс начальных стадий гистогенеза костной ткани практически завершен (Данилов и др., 2000).

Представляет значительный интерес архитекторика клеток в остеотрансплантате: остеобласты располагаются в виде двух структурных композиций (рис. 5*в*, 5*г*). Свободное бесклеточное пространство

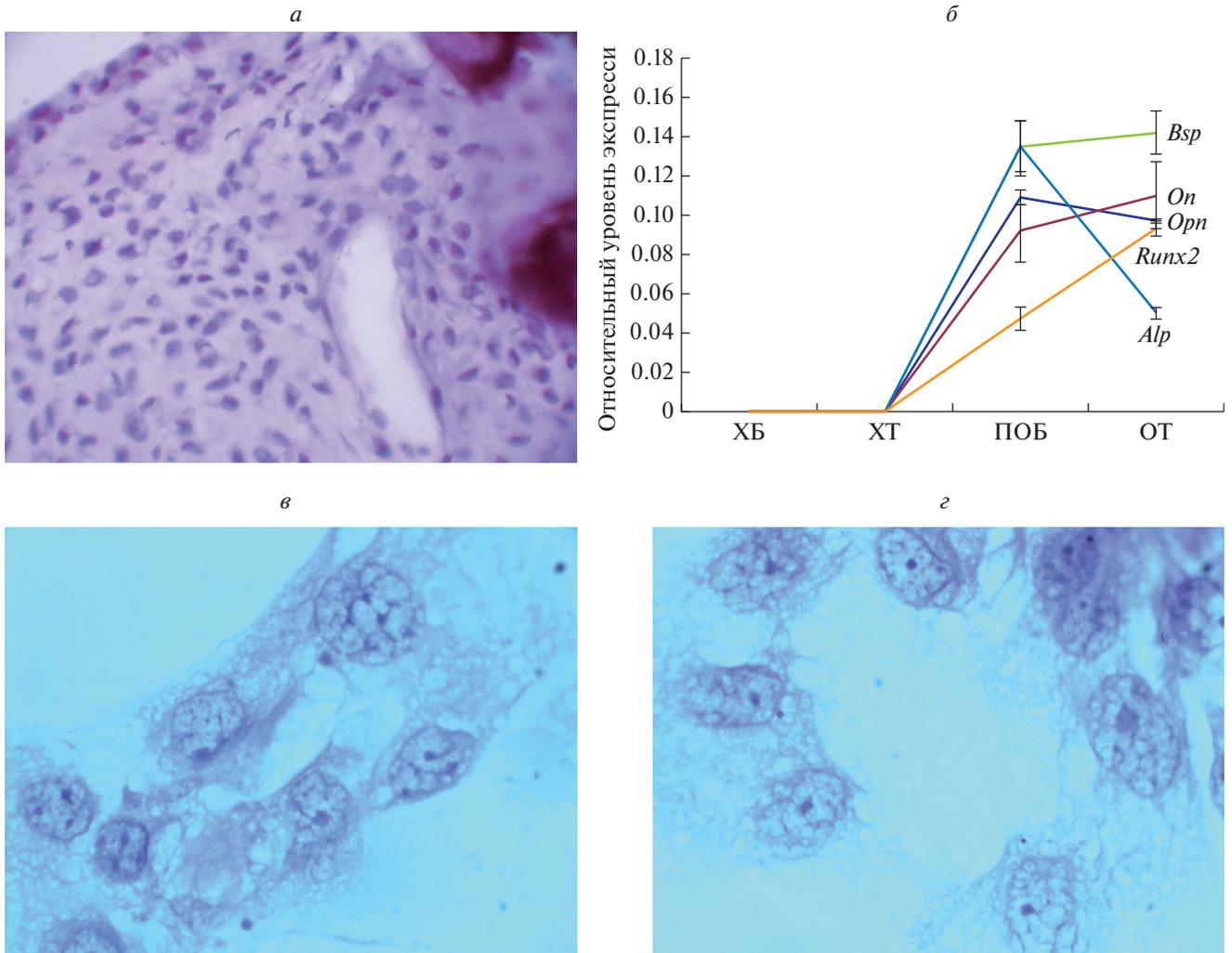


Рис. 5. Остеотрансплантат (ОТ). *а* – Общая структура ОТ; сосуд с эндотелиальной выстилкой; гематоксилин-эозин, об.: 20×. *б* – Относительный уровень экспрессии генов в ОТ; ПЦР в режиме реального времени: ХБ – хондробласты, ХТ – хондротрансплантат, ПОБ – преостеобласты, ОТ – остеотрансплантат; данные представлены средними значениями (\pm SD, вертикальные отрезки). *в*, *г* – Расположение остеобластов в виде двух структурных композиций в ОТ; гематоксилин-эозин, иммерсия, об.: 100×.

матрикса окружено остеобластами в виде многослойного кольца. Во втором варианте остеобласты формируют два параллельных ряда. Возникает вопрос о причинах подобного расположения клеток. Как объяснить двоякую архитектуру выстраивания остеобластов? Исходя из динамики построения структурных композиций можно предполагать, что процесс отражает формирование двух типов костной ткани в онтогенезе – остеонную и трабекулярную. Утверждать подобную возможность, было бы слишком смело, а высказать предположение, вероятно, допустимо. Процесс развития начальных типов костной ткани до сих пор не освещен. Надо полагать, что дальнейшее развитие клеточных технологий поможет заполнить это пробел в начальном гистогенезе костной ткани.

Возникает вопрос: что такое остеогенный трансплантат? Структурно-метаболические преобразования, которые проходит хондротрансплантат в остеогенной среде являются отражением эмбрионального развития и процесса регенерации костной ткани. Экспрессия генов и детекция белков хондрогенной стадии гистогенеза сменяется экспрессией генов и белков остеогенной стадии дифференцировки. Преобразование метаболического профиля, смена канальцевого типа обмена метаболитов на сосудистый (как непреложный атрибут формирования костной ткани), синтез коллагена I типа и щелочной фосфатазы, матричные везикулы в цитоплазме остеобластов и в матриксе, остеогенный тип клеток являются основанием для того, чтобы определить остеотрансплантат как стадию остеогенной дифференцировки

эмбрионального хряща (Drukker et al., 2006). Следующий этап дифференцировки в дефинитивную костную ткань остеотрансплантат проходит в дефекте костной ткани реципиента.

Структурные преобразования остеотрансплантата в реципиентном ложе (дефекте костной ткани). В дефекте костной ткани остеотрансплантат проходит следующие стадии гистогенеза: пролиферации, сосудистой интеграции, остеогенеза и стадию полной интеграции.

Стадия пролиферации. Через семь сут область дефекта костной ткани в теле позвонка заполнена остеотрансплантатом. В центральных отделах остеотрансплантата наблюдается интенсивная пролиферация активных остеобластов (рис. 6а). Здесь сформированы слабоминерализованные трабекулярные структуры, окруженные активными остеобластами. Пролиферирующие остеобласты мигрируют в костное ложе реципиента и откладываются на опилах костных балок таким образом, что формируются анастомозы между регенератом и костными трабекулами реципиента (рис. 6б). Полученные факты свидетельствуют о регенерации в зоне дефекта за счет структурных компонентов остеотрансплантата. Большинство авторов считают, что регенерация дефекта костной ткани осуществляется за счет реципиентного ложа (Деев и др., 2004). Подобные результаты зависят от природы пластического материала. Исследуемый нами остеотрансплантат был получен путем дифференцировки в пределах одного гистогенетического ряда (дифферона): мезенхима, хрящ, кость.

Стадия сосудистой интеграции. Через 14 сут в остеотрансплантате сформирована примитивная костная ткань трабекулярного строения (рис. 6в). Между новообразованными костными структурами располагается остеогенная ткань и сосуды, содержащие элементы крови. Этот факт свидетельствует об интеграции регенерата с системой кровообращения реципиента (экспериментального животного), что является фактором формирования общей сосудистой сети. И дальнейшая регуляция остеогенеза в костной ткани происходит под влиянием гуморальных и локальных факторов, которые поступают с кровью реципиента на общеорганизменном уровне (паратгормон, факторы роста, сигнальные системы и т.д.) (Day et al., 2005; Day, Yang, 2008; Campbell et al., 2015). Активация остеогенеза наблюдается и по периферии остеотрансплантата, прилежащего к краям дефекта. Процесс формирования костной ткани в зоне дефекта и в остеотрансплантате происходит путем прямого остеогенеза.

Стадия остеогенеза. Через 30 сут полость бывшего дефекта замещена вновь сформированной костной тканью. Между трабекулами реципиентного ложа и остеотрансплантатом образуются костные анастомозы. В центральных отделах остеотрансплантата располагается трабекулярная костная ткань с при-

знаками перестройки. Миелоидный костный мозг в межбалочных промежутках отсутствует (рис. 6г).

Стадия полной интеграции. Через 60 сут зона дефекта представлена органоспецифической костной тканью. Границы между костным ложем и остеотрансплантатом удается установить только по степени зрелости костной ткани. В межтрабекулярных пространствах располагается миелоидный костный мозг. Морфологические данные позволяют констатировать, что произошла полная интеграция остеотрансплантата с реципиентным ложем (рис. 6д).

Полная интеграция остеотрансплантата с реципиентным ложем является результатом формирования единой сосудистой системы кровообращения — остеотрансплантат–реципиент. Это значит, что процесс регуляции метаболизма остеотрансплантата осуществляется на общеорганизменном уровне реципиента и тем самым реализует генетическую программу окончательной дифференцировки остеотрансплантата в дефинитивную органоспецифическую костную ткань. Этот процесс можно назвать полной интеграцией: формирование морфологически и генетически однородной костной структуры.

Структурные преобразования аутоотрансплантата в реципиентном ложе (дефекте костной ткани). Через 7 сут зона дефекта костной ткани заполнена аутоотрансплантатом, поверхность которого, прилежащего к реципиентному ложу, узурирована. Процесс остеогенеза не прослеживается (рис. 7а). Через 14 сут продолжается процесс резорбции аутоотрансплантата, вплоть до фрагментации. Из реципиентного ложа между фрагментами аутоотрансплантата проникают сосуды (рис. 7б). Через 30 сут наряду с продолжающейся резорбцией аутоотрансплантата, наблюдается формирование регенерата в виде примитивной костной ткани между фрагментами аутоотрансплантата (рис. 7в). Через 60 сут зона дефекта заполнена грубоволокнистой костной тканью в состоянии ремоделирования (рис. 7г).

Регенерация и интеграция дефекта костной ткани реципиента при пластическом замещении аутоотрансплантатом происходит за счет структурных компонентов реципиента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хондротрансплантат в остеогенной среде проходит ряд структурно-метаболических и генетических преобразований. В результате формируется остеогенный трансплантат подобный эмбриональной предкостной ткани. Исходом пластического замещения дефекта костной ткани остеотрансплантатом является формирование органоспецифического регенерата, встраивающегося в общую систему гомеостаза организма реципиента.

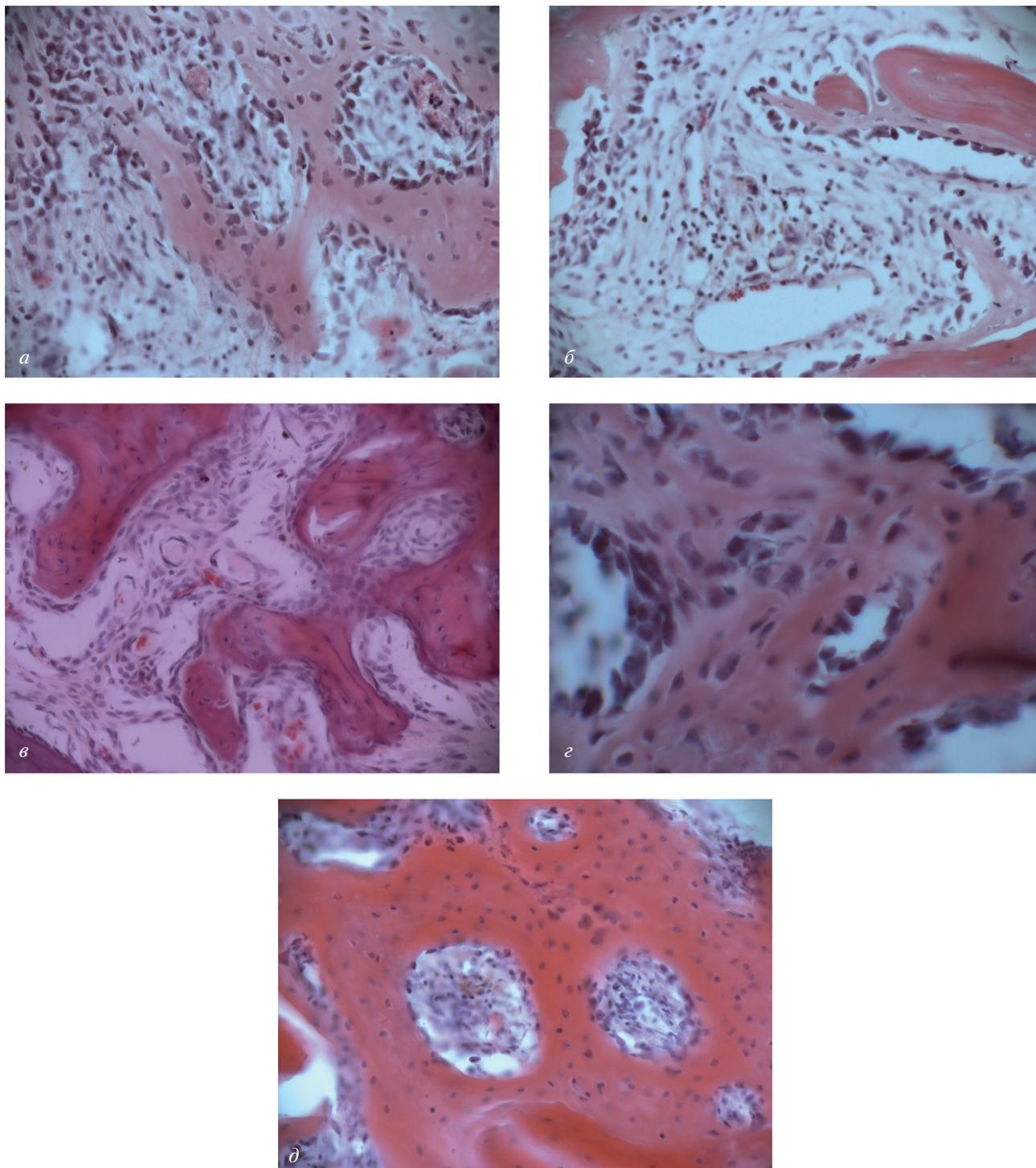


Рис. 6. Структурные преобразования остеотрансплантата (ОТ) в реципиентном ложе. *а* – Стадия пролиферации активных остеобластов через 7 сут после трансплантации. *б* – Эритроциты в сосудах ОТ; формирование анастомозов между регенератом и костными трабекулами реципиента. *в* – Стадия сосудистой и тканевой интеграции; в межтрабекулярных пространствах сосуды, заполненные кровью реципиента; формирование костных анастомозов между ОТ и реципиентным ложем. *г* – Стадия оссификации; в зоне бывшего дефекта сформирован костный регенерат в состоянии перестройки. *д* – Стадия полной интеграции; между образованными костными трабекулами расположен миелоидный костный мозг. Окраска гематоксилин-эозином, об.: 20× или 40× (*г*).

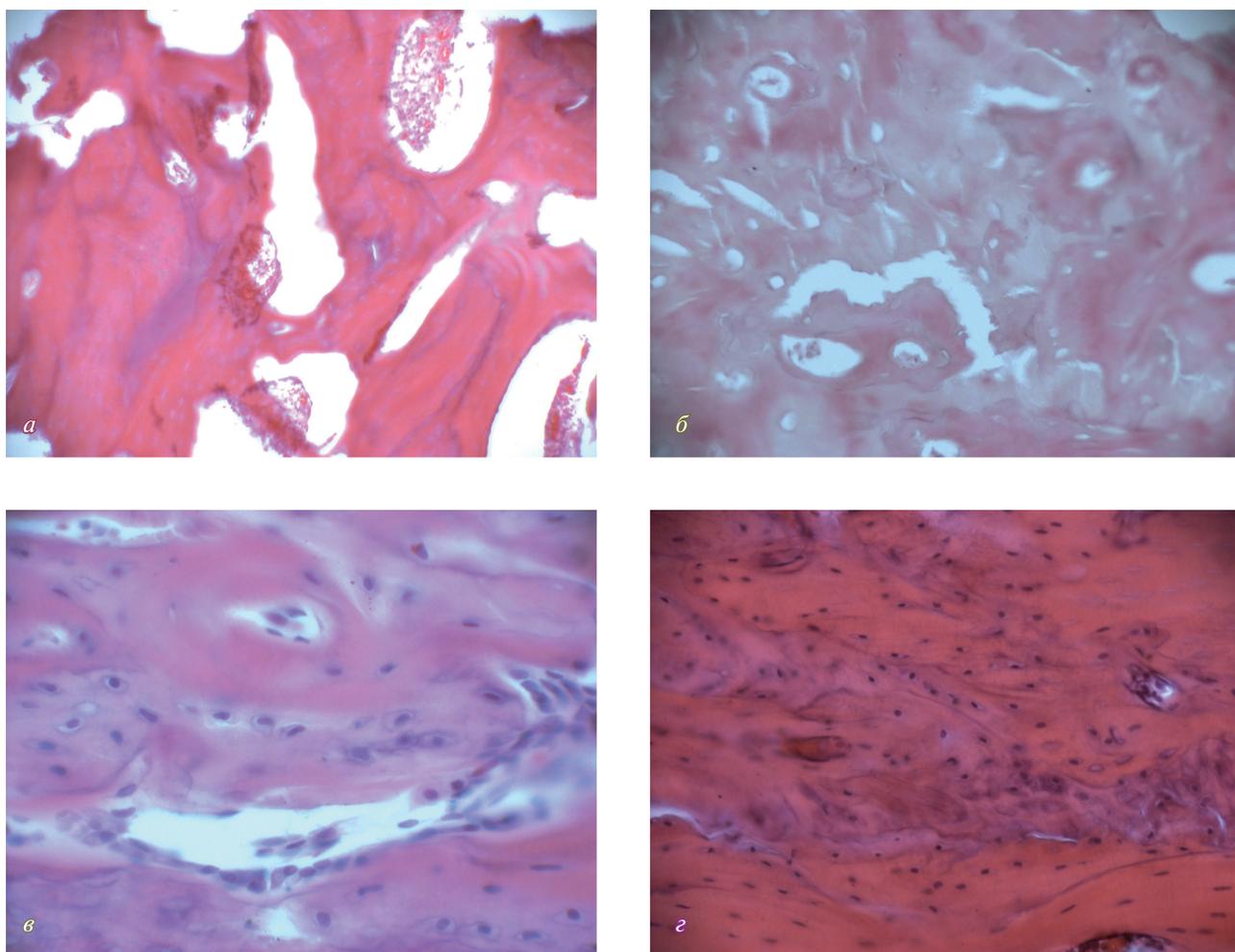


Рис. 7. Резорбция аутотрансплантата через 7 сут (*а*) и его фрагментация через 14 сут (*б*) после пластики. На поверхности без-остеоцитных балок наблюдается регенерация костной ткани (*в*). Через 60 сут дефекта заполнена грубоволокнистой костной тканью в состоянии ремоделирования (*г*). Окраска гематоксилин-эозином, об.: 10× (*а, б*), 40× (*в*) и 20× (*г*).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам Института цитологии и генетики П.М. Бородину и О.Л. Серову за ценные советы и консультации в процессе выполнения этой работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы выполнены в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ на выполнение научно-исследовательских работ и разработок (номер гос. регистрации 115071510020).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с участием животных выполнены с соблюдением положений Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации и Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (согласно Приказу Министер-

ства Здравоохранения Российской Федерации от 19.03.2003 г. № 226). Разрешение на проведение работ было получено на заседании локального Этического Комитета Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России (протокол заседания № 019/15 от 28 декабря 2015 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гололобов В.Г., Деев Р.В. 2003. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон. Морфология. 5 : 9–19. (Gololobov V.G., Deev R.V. 2003. Stvolovye stromal'nye kletki i osteoblasticheskiy kletochnyj differon. Morfologiya. 5 : 9–19. (In Russ.))

- Данилов Р.К., Боровая Н.Д., Клочков Т.Г. 2000. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей. Некоторые итоги XX века и перспективы дальнейших исследований. Морфология. 118(4) : 7–16. (Danilov R.K., Borovaya N.D., Klochkov T.G. 2000. Eksperimental'no-gistologicheskij analiz gistogeneza i regeneracii tkanej. Nekotorye itogi XX veka i perspektivy dal'nejshih issledovanij. Morfologiya. 118(4) : 7–16. (In Russ.))
- Деев Р.В., Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Гололобов В.Г., Патокин И.Л., Пинаев Г.П. 2004. Формирование и морфофункциональная характеристика остеобластического фенотипа в клеточных культурах *in vitro*. Цитология. 46(3) : 185–190. (Deev R.V., Nikolaenko N.S., Tsupkina N.V., Gololobov V.G., Patokin I.L., Pinaev G.P. 2004. Development and morphofunctional characterization of the osteoblastic phenotype in cell culture *in vitro*. Tsitologiya. 46(3) : 185–190. (In Russ.))
- Дергилев К.В., Макаревич П.И., Меньшиков М.Ю., Парфёнова Е.В. 2016. Применение тканеинженерных конструкций на основе пластов клеток для восстановления тканей и органов. Гены и Клетки. XI(3) : 23–32. (Dergilev K.V., Makarevich P.I., Menshikov M.Yu., Parfyonova E.V. 2016. Application of tissue engineered constructs on the basis of cell sheets for restoration of tissues and organs. Genes & Cells. XI(3) : 23–32. (In Russ.)) https://elibrary.ru/download/elibrary_29321516_85895974.pdf
- Заварзин А.А. 1976. Основы частной цитологии и сравнительной гистологии многоклеточных животных. Л. : Наука. 441 с. (Zavarzin A.A. 1976. Osnovy chastnoj citologii i sravnitel'noj gistologii mnogokletochnyh zhivotnyh. Leningrad: Nauka. 441 pp. (In Russ.))
- Зайдман А.М., Бородин Ю.И. 2015. Морфогенез межпозвонкового остеохондроза. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 11(4) : 523–526. (Zaydman A.M., Borodin U.I. 2015. Morphogenesis of intervertebral osteochondrosis. Int. J. Applied Fund. Res. 11(4) : 523–526. (In Russ.))
- Зайдман А.М., Ким И.И., Садовой М.А. 2010. Способ получения трехмерного хондротрансплантата. Патент 2392973 РФ: МПК А61L27/38. Заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи. № 2008103109/15; заявл. 28.01.2008; опубл. 27.06.2010, Бюл. № 18. 11 с. (Zaydman A.M., Kim I.I., Sadovoy M.A. 2010. Sposob polucheniya trekhmernogo khondrotransplantata. Patent. 2392973 RF: MPK A61L27/38 Zayavitel i patentoobladatel Federalnoye gosudarstvennoye uchrezhdeniye Novosibirskiy nauchno-issledovatel'skiy institut travmatologii i ortopedii Federalnogo agentstva po vysokotekhnologichnoy meditsinskoj pomoshchi. № 2008103109/15; zayavl. 28.01.2008; opubl. 27.06.2010. Byul. № 18. 11 p. (In Russ.))
- Зайдман А.М., Корель А.В., Щелкунова Е.И., Иванова Н.А. 2016. Способ получения трехмерного остеохондротрансплантата. Патент 2574942 РФ: МПК А61L27/24, А61L27/38, А61K35/28, А61R19/00. Заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение “Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна” Министерства здравоохранения Российской Федерации. № 2014145384/15; заявл. 11.11.2014; опубл. 10.02.2016, Бюл. № 4. 8 с. (Zaydman A.M., Korel A.V., Shchelkunova E.I., Ivanova N.A. 2016. Sposob polucheniya trekhmernogo osteotransplantata. Patent. 2574942 RF: MPK A61L27/24, A61L27/38, A61K35/28, A61R19/00. Zayavitel i patentoobladatel Federalnoye gosudarstvennoye byudzhethnoye uchrezhdeniye “Novosibirskiy nauchno-issledovatel'skiy institut travmatologii i ortopedii im. Ya.L. Tsviana” Ministerstva zdravookhraneniya Rossiyskoj Federatsii. № 2014145384/15; zayavl. 11.11.2014; opubl. 10.02.2016. Byul. № 4. 8 p. (In Russ.))
- Зайдман А.М., Михайловский М.В., Завьялова Е.Л., Сузда-лов В.А., Садовой М.А. 2010. Структурно-функциональные особенности деформации позвоночника при нейрофиброматозе NF-1. Бюллетень сибирской медицины. 9(6) : 34–40. (Zaidman A.M., Mikhailovsky M.V., Zaviyalova Y.L., Suzdalov V.A., Sadovoy M.A. 2010. Structural and functional peculiarities of spine deformity development in neurofibromatosis NF-1. Bull. Siberian Med. 9(6) : 34–40. (In Russ.) doi 10.20538/1682-0363-2010-6-34-40)
- Зайдман А.М., Щелкунова Е.И., Строчкова Е.Л., Корель А.В., Рахматиллаев Ш.Н., Шевченко А.И. 2012. Трехмерный хондротрансплантат – пластический материал для замещения дефектов костной ткани. Хирургия позвоночника. 4 : 65–72. (Zaidman A.M., Shchelkunova E.I., Strokovaya E.L., Korel A.V., Rakhmatillaev Sh.N., Shevchenko A.I. 2012. 3D chondrograft: bone defect replacement material. Hirurgiya pozvonochnika. 4 : 65–72. (In Russ.) doi 10.14531/ss2012.4.65-72)
- Зайдман А.М., Щелкунова Е.И., Строчкова Е.Л., Шевченко А.И., Ластевский А.Д., Перих В.В. 2013. Коррекция патологических изменений межпозвонкового диска методами тканевой инженерии в эксперименте. Хирургия позвоночника. 1 : 80–88. (Zaidman A.M., Shchelkunova E.I., Strokovaya E.L., Shevchenko A.I., Lastevsky A.D., Rerikh V.V. 2013. Experimental correction of pathological changes in the intervertebral disc using tissue engineering. Hirurgiya pozvonochnika. 1 : 080–088. (In Russ.) doi 10.14531/ss2013.1.80–88)
- Корель А.В., Зайдман А.М., Колокольцева Т.Д. 2006. Способ получения донорских хондробластов. Патент 2285039 РФ: МПК С12N 5/06. Заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение “Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии” МЗ РФ. № 2004120645; заявл. 06.07.2004; опубл. 10.10.2006, Бюл. № 28. 7 с. (Korel A.V., Zaydman A.M., Kolokoltseva T.D. 2006. Sposob polucheniya donorskih khondroblastov. Patent. 2285039 RF: MPK C12N 5/06. Zayavitel i patentoobladatel “Novosibirskiy nauchno-issledovatel'skiy institut travmatologii i ortopedii” MZ RF. № 2004120645; zayavl. 06.07.2004; opubl. 10.10.2006, byull. № 28. 7 p. (In Russ.))
- Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.И. 2010. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). М.: Известия. 1. 395 с. (Omel'yanenko N.P., Sluckij L.I. 2010. Soedinitel'naya tkan' (gistofiziologiya i biokhimiya). M.: Izvestiya. 1. 395 p. (In Russ.))
- Родан Г.А., Родан С.Б. 2000. Костные клетки. Остеопороз. М.-СПб. : Бином-Невский диалект. 15–84. (Rodan G.A., Rodan S.B. 2000. Kostnye kletki. Osteoporoz. Moscow–St.Petersburg: Binom-Nevskij dialekt. 15–84. (In Russ.))
- Родионова Н.В. 1989. Функциональная морфология клеток в остеогенезе. М.: Новукова думка. 192 с. (Rodionova N.V. 1989. Funktsional'naya morfologiya kletok v osteogeneze. M.: Novukova dumka. 192 s. (Rodionova

- va N.V. 1989. Funkcional'naya morfologiya kletok v osteogeneze. M.: Novukova dumka. 192 pp. (In Russ.)
- Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. 1980. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М.: Медицина. 216 с. (Fridenshtejn A.Ya., Luriya E.A. 1980. Kletochnye osnovy krovetvornogo mikrookruzeniya. M.: Medicina. 216 p. (In Russ.))
- Фриденштейн А.Я., Чертков И.А. 1969. Клеточные основы иммунитета. М.: Медицина. 256 с. (Fridenshtejn A.Ya., Chertkov I.A. 1969. Kletochnye osnovy immuniteta. M.: Medicina. 256 p. (In Russ.))
- Хэм А., Кормак Д. 1983. Гистология. М.: Мир. 5. 296 с. (Hehm A., Kormak D. 1983. Gistologiya. M.: Mir. 5. 296 pp. (In Russ.))
- Anderson H.C., Garimella R., Tague S.E. 2005. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci.* 10 : 822–837.
- Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A. 2012. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 30(10) : 546–554. doi 10.1016/j.tibtech.2012.07.005
- Campbell E.J., Campbell G.M., Hanley D.A. 2015. The effect of parathyroid hormone and teriparatide on fracture healing. *Expert Opinion Biol. Ther.* 1 : 119–129.
- Claes L., Recknagel S., Ignatius A. 2012. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8 : 133–143.
- Dai J., Rabie A.B. 2007. VEGF: An essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J. Dent Res.* 86 : 937–950.
- Day T.F., Guo X., Garrett-Beal L., Yang Y. 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* 8 : 739–750.
- Day T.F., Yang Y. 2008. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J. Bone Joint Surgery – Series A.* 90. Issue SUPPL. 1 : 19–24.
- Deckers M.M., van Bezooijen R.L., van der Horst G., Hoogendam J., van Der Bent C., Papapoulos S.E., Clemens W.G.M. 2002. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinol.* 143 : 1545–1553.
- Drukker M., Katchman H., Katz G., Eventov-Friedman S., Shezen E., Hornstein E., Mandelboim O., Reisner Y., Benvenisty N. 2006. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells.* 24 : 221–229.
- Franceschi R.T., Ge C., Xiao G., Roca H., Jiang D. 2009. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tiss. Organs.* 189 : 144–152.
- Franz-Odenaal T.A., Hall B.K., Witten P.E. 2006. Buried alive – how osteoblasts become osteocytes. *Dev. Biol.* 235 : 176–190.
- Gong Y.Y., Xue J.X., Zhang W.J., Zhou G.D., Liu W., Cao Y. 2011. A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes. *Biomaterials.* 32 : 2265–2273.
- Javassoli M., Fridenstein A. 1983. Homopoietic stromal microenvironmentally. *American Hematol.* 15 : 151–203.
- Kairiyama E. 2016. Legal system for tissue banking in Latin America. In: *Legal basis of global tissue banking. A proactive clinical perspectives.* Singapore: World Scientific. 149–196.
- Kaneshiro N., Sato M., Ishihara M., Mitani G., Sakai H., Kikuchi T., Mochida J. 2007. Cultured articular chondrocytes sheets for partial thickness cartilage defects utilizing temperature – responsive culture dishes. *Eur. Cells Materials.* 13 : 87–92. doi 10.22203/eCM.v013a09
- Kiyoto I., Masaharu T., Fujio S. 1966. Merckell's cartilage chondrocytes erode bone-linke matrix and further transform into osteocyte-like cells in culture. *Anat. Rec.* 245. 1 : 25–35.
- Komori T. 2008. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci.* 13 : 898–903.
- Maes C., Carmeliet P., Moermans K., Stockmans I., Smets N., Collen D., Bouillon R., Carmeliet G. 2002. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF 164 and VEGF 188. *Mech Dev.* 111 : 61–73.
- Nasharu T.N., Martinez-Fernandez A., fur zic A. 2010. Induced pluripotent stem cells: Developmental biology to regenerative medicine. *Nat. Rev. Cardiol.* 7 : 700–710.
- Roach H.I., Erenpreisa J., Aigner T. 1955. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell division and apoptosis. *J. Cell Biol.* 131 : 483–494.
- Rodan G.A., Heath J.K., Yoon K., Noda M., Rodan S.B. 1988. Diversity of the osteoblastic phenotype. In: *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues.* N.Y.: John Wiley & Sons. 78–85.
- Samavedi S., Whittington A. R., Goldstein A.S. 2013. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Review. Acta Biomaterialia.* 9 : 8037–8045.
- Street J., Bao M., de Guzman L., Bunting S., Peale F.V., Ferrara N., Steinmetz H., Hoeffel J., Cleland J.L., Daugherty A., van Bruggen N., Redmond H.P., Carano R.A., Filvaroff E.H. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 : 9656–9661.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2013. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development.* 140 : 2457–2461. doi 10.1242/dev.092551
- Wang Y., Wan C., Deng L., Liu X., Cao X., Gilbert S.R., Mary L. Bouxsein M.L., Faugere M.C., Goldberg R.E., Gerstenfeld L.C., Haase V.H., Johnson R.S., Schipani E., Clemens T. 2007. The hypoxia-inducible factor a pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J. Clin. Invest.* 117 : 1616–1626.
- Weismann P., Meyer U., Plate U., Honling H.Y. 2005. Aspects of collagen mineralisation in hard tissue formation. *Int. Rev. Cytol.* 1 : 121–156.

HISTOGENESIS STAGES OF OSTEOGENIC GRAFT IN THE CULTURE MEDIUM AND IN THE RECIPIENT BED

A. M. Zaydman^{a,*}, I. A. Shevchenko^b, E. L. Strokova^a, A. F. Gusev^{a,c}, N. Yu. Pakhomova^a,
I. A. Kirilova^a, V. V. Rerikh^{a,c}, and V. M. Subbotin^d

^a*Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Novosibirsk, 630091 Russia*

^b*Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

^c*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 630091 Russia*

^d*Arrowhead Pharmaceuticals, Madison WI, and University of Pittsburgh, Pittsburgh PA, USA*

*e-mail: AZaydman@niito.ru

The article presents the stages of osteogenic differentiation of chondrogenic graft in the culture medium and in the recipient bed (defect of bone tissue). In the culture medium, cell and matrix transformations, and formation of vascular cavities with an endothelial lining and of matrix vesicles in osteoblasts (first stage of mineralization) take place in the chondrograft. Gene expression and detection of chondrogenic type proteins are replaced by expression of genes and detection of proteins of osteogenic stage of differentiation. Further stages of bone tissue histogenesis occur in the recipient bed. Humoral regulation factors and plastic substance enters through the formed anastomosis of the vessels of osteodysplastica and recipient, from which factors of humoral regulation and plastic substances are supplied, on the basis of which the formation of an organ-specific regenerate is completed with full integration into the recipient's organism. The study results are the basis for further use of the osteogenic graft in clinical practice.

Keywords: osteograft, chondrograft, gene expression, calcification, matrix vesicles, integration, osteogenesis, regeneration