

© Коллектив авторов, 2015

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НЕПОЛНОСЛОЙНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА СУСТАВОВ КРОЛИКОВ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

Р.К. Чайлахян, А.Б. Шехтер, В.И. Тельпухов, С.В. Иванников, Ю.В. Герасимов, Н.Н. Воробьева, И.Л. Москвина, В.Н. Баграташвили

ФГБУ «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; ФГБУН «Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН», Москва, РФ

Изучена возможность восстановления целостности гиалинового хряща с помощью мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на модели неполнослойного дефекта гиалинового хряща сустава кролика без повреждения субхондральной пластинки. Размер дефекта составлял 0,5 см в диаметре и 1,5 мм в глубину. Аутологичный костный мозг кроликов получали из резецированного крыла подвздошной кости, готовили одноклеточную суспензию и высевали в культуральные флаконы. Выросшие ММСК снимали с пластика, центрифугировали и осадок переносили в дефект хряща. Сверху клетки прикрывали желатиновой губкой, викриловой губкой или сеткой. Гистологическое исследование выполняли через 4 мес. Установлено, что наиболее выраженная регенерация гиалиновой хрящевой ткани, замещающей большую часть дефекта хрящевой пластинки, имела место в случаях использования ММСК и викриловой сетки. Среди преимуществ использования викриловой сетки отмечено то, что она не выступает над хрящевой пластинкой, не сдавливает клетки и при этом медленно рассасывается.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, пролиферация, тканеинженерные конструкции, суставной хрящ.

Repair of Partial Thickness Articular Hyaline Cartilage Injuries with Multipotent Mesenchymal Stromal Bone Marrow Cells Transplantation in Rabbits

R.K. Chailakhyan, A.B. Shekhter, V.I. Tel'pukhov, S.V. Ivannikov, Yu.V. Gerasimov, N.N. Vorobieva, I.L. Moskvina, V.N. Bagratashvili

Gamalei Scientific Research Center of Epidemiology and Microbiology; I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; Institute on Laser and Information Technologies, Moscow, Russia

Possibility of hyaline cartilage integrity restoration using multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) was studied on the rabbit model of partial thickness articular hyaline cartilage defect without subchondral plate damage. Size of defect made up 0.5 cm in diameter and 1.5 mm deep. Autologous bone marrow was harvested from the resected upper flaring portion of the ilium, single cell suspension was prepared and cultured in matrasses. Grown MMSC were centrifuged and the sediment was transferred into the cartilage defect. The cells were covered with either vicryl or gelatin sponge, or vicryl mesh. Histologic examination was performed in 4 months. It was shown that the most active regeneration of hyaline cartilage tissue, that substituted the largest part of a defect, was noted when MMSC were covered with vicryl mesh. One of the advantages of vicryl mesh use was that it neither protruded above the cartilaginous plate nor compressed the cells, and slowly resolved.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, proliferation, tissue engineering constructions, articular cartilage.

Бурное развитие биомедицины и, в частности, клеточных исследований способствовало появлению совершенно новых подходов и технологий, обещающих уже в ближайшем будущем решение многих медицинских проблем. Клеточные исследования и клеточные технологии являются сегодня стратегически важным направлением био-

медицины, способным обеспечить прорыв в борьбе с социально значимыми заболеваниями. Возможность гистотипического восстановления поврежденных тканей и органов приобрела реальные очертания после разработки нами в НИИЭМ им Н.Ф. Гамалеи метода избирательного клонирования, который позволил выявить уникальную

категорию стромальных клеток-предшественников кроветворных и лимфоидных органов [1]. Концентрация этих клеток в органах гемо- и лимфопоза чрезвычайно мала. Проведенные экспериментальные исследования показали, что среди выявленных нами клоногенных стромальных клеток-предшественников имеются клетки, которые по своим пролиферативным и дифференцировочным потенциам являются претендентами на роль стволовых клеток стромальной ткани костного мозга [2, 3]. По решению международного общества клеточных технологов с 2006 г. эти клетки предложено называть мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК). Они соответствуют требованиям, предъявляемым к стволовым клеткам: обладают высоким пролиферативным потенциалом, самоподдерживаются в процессе пролиферации и дифференцируются в нескольких направлениях (кость, хрящ, соединительная и жировая ткани и т.д.).

Одной из наиболее актуальных является проблема лечения повреждений хряща и их последствий, т.е. восстановления целостности гиалинового хряща крупных суставов. Эта проблема сегодня приобретает все большую значимость как в медицинском, так и социальном аспекте. Посредством компрессионно-дистракционного метода клиницисты в определенной степени научились влиять на скорость и качество репаративных процессов костной ткани, что привело к существенному улучшению результатов лечения. В то же время прогресс в лечении суставной патологии, который был достигнут в значительной мере благодаря созданию и усовершенствованию искусственных суставов, по сути не приблизил к решению вопроса о регенерационных возможностях компонентов синовиальной среды сустава и наиболее важного из них — суставного хряща. Согласно данным статистики, при травмах коленного сустава в 50–60% случаев в ходе артроскопии выявляются повреждения мышечков и надколенника, не проникающие в подлежащую кость. Приблизительно с такой же частотой повреждения хряща диагностируют при травмах других крупных суставов. Указанные изменения объединены под общим названием «хондропатии».

Невозможность восстановления суставного хряща при его неполнослойном повреждении авторы связывают с неспособностью хондроцитов вступать в митоз, продуцированием ими ингибиторов для пролиферации менее дифференцированных клеток, снижением интенсивности процессов обмена и особенностями питания. Использование многочисленных методов лечения — от медикаментозных, механических, физических до пересадки в область поврежденного хряща биологических трансплантатов — не позволяло достигать желаемого результата [4]. В отдельную группу можно выделить методы лечения, предусматривающие пересадку хондроцитов, выращен-

ных *in vitro* [5–7]. Пересадка аутологичных хондроцитов, полученных из так называемой «некритической, или неконтактной, зоны» здорового сустава и размноженных *in vitro*, предполагает нанесение дополнительной травмы. К тому же неясно, способны ли хондроциты, находящиеся в терминальной стадии дифференцировки, полученные из небольшого фрагмента хряща (20–30 мг), пройти необходимое число митозов и образовывать клеточную массу в объеме, достаточном для трансплантации и последующего замещения дефекта [8]. В экспериментальных исследованиях и клинических испытаниях показано, что трансплантация выращенных аутологичных хондроцитов под надкостницу или иные мембраны, пришитые к границам дефекта хряща, оказалась менее эффективной, чем обычная мозаичная хондропластика [9]. В последнее десятилетие использование с этой целью ММСК стало привлекать большее внимание исследователей и врачей. Одни авторы, работая с ММСК и не веря в их дифференцировочные потенции, перед обратной трансплантацией проводят их направленную дифференцировку в хондроциты [10], другие — помещают ММСК в различные гели или скаффолды [11, 12]. Недостатком перечисленных методов можно считать то, что дефекты, как правило, заполняются фиброзным хрящом.

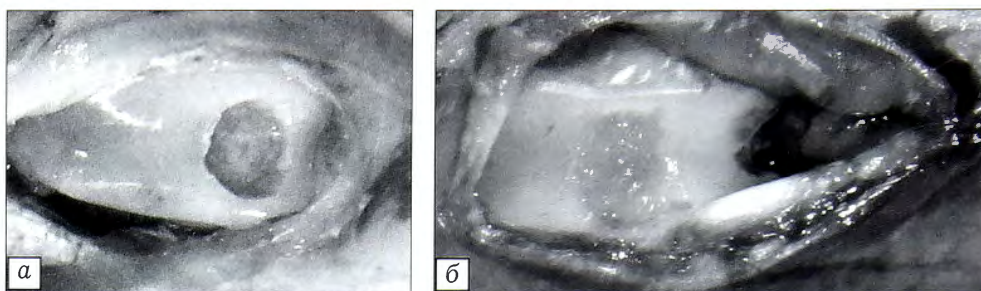
Целью настоящего исследования являлось изучение возможности восстановления целостности гиалинового хряща коленного сустава кролика в неполнослойных дефектах с помощью ММСК и биodeградируемых скаффолдов (носителей), характеризующихся различным временем биорезорбции (от 56 до 90 дней).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 15 кроликах породы Шиншилла массой 2–2,5 кг, полученных из питомника лабораторных животных РАМН «Крюково». Все операции проводили под наркозом с использованием разрешенных в ветеринарии препаратов (золетил и рометар) и с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Животных содержали в соответствии с действующим приказом министра здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Выведение животных из эксперимента осуществляли путем передозировки наркоза.

Для моделирования дефекта гиалинового хряща использовали коленный сустав. Глубину дефекта ограничили поверхностным слоем суставного хряща — только до субхондральной пластинки. Надколенник смещали и фиксировали в медиальном положении. В межмышечковой ямке, под надколенником, фрезой снимали поверхностный слой гиалинового хряща строго определенного размера — 0,5 см в диаметре и 1,5 мм глубиной, не допус-

Рис. 1. Макроскопическая картина хрящевых дефектов. *а* — неполнослойный дефект хряща в межмыщелковой ямке коленного сустава; *б* — сгусток клеток на дне костного дефекта.



кая появления «кровяной росы» на дне дефекта (рис. 1, *а*).

Было сформировано 3 группы: 1-я — контроль без хондропластики (3 кролика); 2-я — контроль с хондропластикой резорбируемыми материалами (желатиновая губка, викриловая губка или сетка — 3 кролика), 3-я — хондропластика ММСК и резорбируемыми материалами (9 кроликов).

Получение аутологичного костного мозга кроликов. Под местной анестезией 0,5% раствором новокаина производили разрез кожи и мышц над крылом тазовой кости, резецировали ее фрагмент и переносили в сухую чашку Петри. Осуществляли гемостаз, рану послойно зашивали. Вырезанный фрагмент кости освобождали от мягких тканей, расщепляли скальпелем и обе половины переносили в чашку Петри с питательной средой. Костный мозг выскабливали в питательную среду, которую затем переносили во флакон. Для приготовления клеточной взвеси фрагменты костного мозга пропускали через шприц с последовательно уменьшающимся диаметром игл. Готовую суспензию фильтровали через четырехслойный капроновый фильтр, подсчитывали число клеток и эксплантировали во флаконы с полной питательной средой.

Эксплантация, культивирование и пассирование клеток. Эксплантацию костномозговых клеток кролика проводили в пластиковые флаконы («Nunc») с площадью дна 80 см^2 по $5 \cdot 10^6$ в каждый. Культуральная среда состояла из 80% среды α -MEM («Sigma») и 20% эмбриональной телячьей сыворотки («Nuclo») и антибиотиков. Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C с 5% CO_2 в течение 12–14 дней. Для получения штаммов костномозговых стромальных клеток культуры промывали чистой средой и в течение 3–5 мин обрабатывали 0,25% раствором трипсина. Затем трипсин сливали и флаконы на 10–15 мин помещали в термостат при 37°C . По истечении этого времени во флаконы добавляли свежую культуральную среду, встряхивали их, а не открепившиеся клетки снимали пипетированием. Производили подсчет клеток в камере Горяева и необходимое количество клеток переносили в новые флаконы с полной культуральной средой. Полученную взвесь ММСК кролика I–III пассажа разливали в конические пробирки по $1\text{--}1,5 \cdot 10^6$ клеток в каждую и центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 1000 об/мин при 4°C .

Трансплантацию ММСК осуществляли двумя способами: 1) осадок ресуспендировали в 2–3 мл свежей среды и заполняли желатиновую либо викриловую губку или сетку, которые укладывали в сформированный неполнослойный дефект гиалинового хряща сустава; 2) осадок в виде сгустка клеток переносили и укладывали на дно дефекта, а сверху прикрывали одним из испытуемых материалов (рис. 1, *б*).

В экспериментах с хондропластикой резорбируемыми материалами трансплантат вырезали чуть больше 0,5 см в диаметре, с таким расчетом, чтобы он плотно входил в дефект хряща. Сверху его укрывали надколенником. Дополнительной фиксации не требовалось.

Всех животных выводили из эксперимента спустя 4 мес после операции. Участок хрящевой пластинки с подлежащей субхондральной костью в области дефекта фиксировали 10% формалином, подвергали декальцинации и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, толуидиновым синим (на кислые гликозаминогликаны), просматривали в микроскопе ВХ-450 и фотографировали с помощью видеокамеры Sony.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дефекты хряща у животных 1-й группы (контроль) макроскопически были полностью заполнены тканью белесоватого цвета с неровными краями, слегка выступающими над хрящевой поверхностью сустава.

При гистологическом исследовании в области дефекта хряща пластинки без хондропластики выявляли истонченный слой хрящевой пластинки без формирования блестящей пластинки на поверхности. В хрящевой ткани встречались дистрофически и некробиотически измененные хондроциты, отмечалось уменьшение содержания кислых гликозаминогликанов (рис. 2, *а*). При этом в центре дефекта отсутствовали признаки регенерации (даже многоклеточные изогенные группы). На периферии дефекта, т.е. на границе с нативной хрящевой тканью, наблюдали регенерацию фиброзного хряща, содержащего многочисленные хондроциты и имеющего волокнистую структуру матрикса.

После хондропластики суставного дефекта резорбируемым материалом из викриловой или желатиновой губки и викриловой сетки (2-я группа)

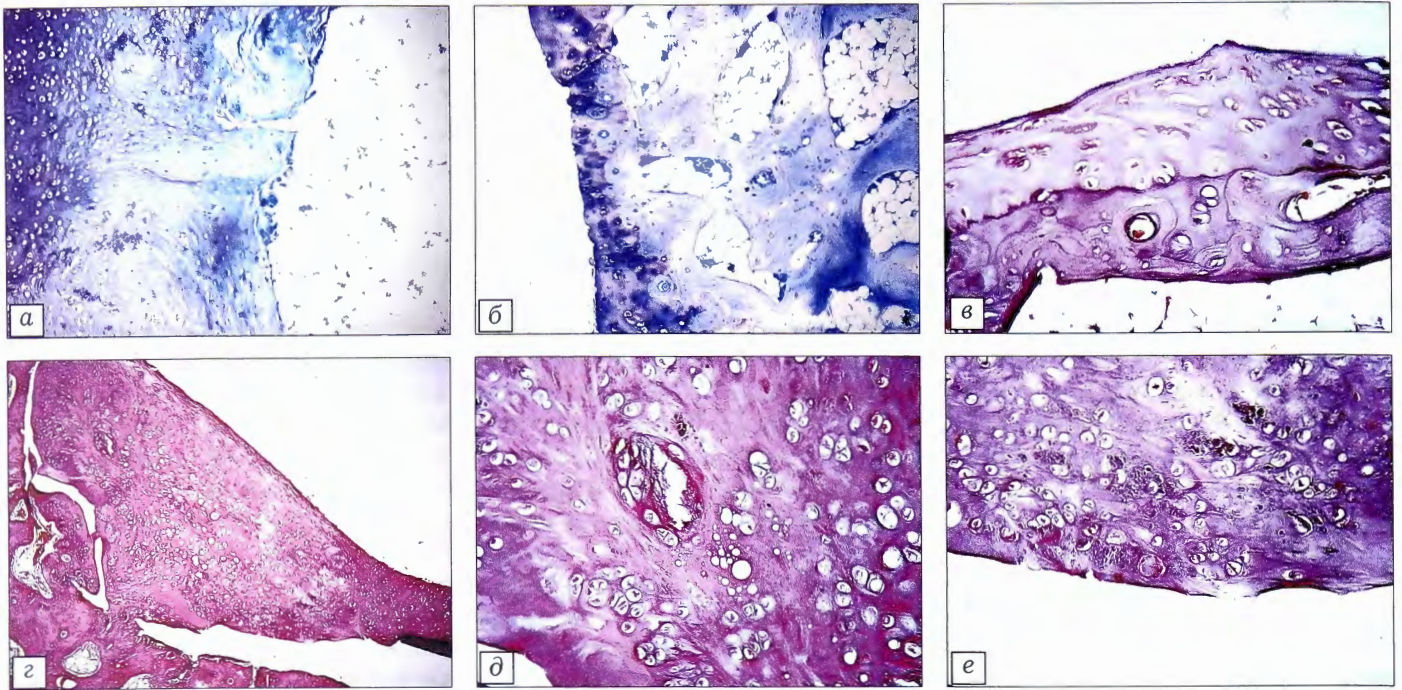


Рис. 2. Дефект хряща через 4 мес.

a — контрольная группа (без хондропластики). $\times 200$; *б* — имплантат — викариловая губка ($\times 400$), на дне дефекта хрящевой пластинки дистрофические и некротические изменения; *в* — имплантат — викариловая сетка ($\times 400$): на краях дефекта сформирован переходный фиброгиалиновый хрящ; *г* — имплантат — ММСК и викариловая сетка ($\times 100$): большая часть дефекта заполнена тканью новообразованного гиалинового хряща; *д* — деталь рис. 2, *г* ($\times 400$): гиалиновый хрящ с гомогенным матриксом, хондроцитами и хондробластами. В центре — остаток викарилового волокна, окраска гематоксилином и эозином, *е* — деталь рис. 2, *г* ($\times 400$): глыбки распавшего викарила в хрящевой ткани. *a, б* — окраска толуидиновым синим, *в-е* — гематоксилином и эозином.

через 4 мес независимо от материала хондропластики макроскопически область дефекта заполнялась тканью со сравнительно гладкой поверхностью.

Гистологически при использовании в качестве имплантата викариловой губки в оставшейся на дне дефекта хрящевой пластинке наблюдались выраженные дистрофические и некротические изменения при отсутствии признаков формирования фиброзного хряща на периферии (рис. 2, б). Структура дефекта, заполненного желатиновой губкой, напоминала таковую в контроле. В центральной части дефекта визуализировались дистрофические и некротические изменения, а на периферии формировался фиброзный хрящ. В случае применения для хондропластики викариловой сетки наблюдали образование незначительного количества фиброгиалинового хряща со стороны материнского ложа.

Таким образом, ни один из изучаемых материалов достоверно не усиливал регенеративные процессы по сравнению с контролем. Исключением стал один случай использования в качестве имплантата викариловой сетки, в котором на краях дефекта формировался переходный фиброгиалиновый хрящ (рис. 2, в).

В 3-й группе для хондропластики применяли ММСК в комбинации с резорбируемыми викариловой или желатиновой губкой и викариловой сеткой.

Во всех случаях через 4 мес дефекты были заполнены вновь образованной тканью.

По данным гистологического исследования при использовании для укрытия клеток викариловой или желатиновой губки в центре неполнослойных дефектов суставного хряща отмечались дистрофически измененные хондроциты. Местами отмечали увеличение числа хондроцитов и многоклеточных изогенных групп (клонов), что является признаком начальных этапов регенерации гиалинового хряща.

Изучение области дефекта со сгустком ММСК, прикрытым имплантатом из викариловой сетки, показало, что дефект заполнен незрелым гиалиновым хрящом, содержащим многочисленные гиалиновые хондроциты, окруженные лакунами (рис. 2, г). Характерный для гиалинового хряща гомогенный матрикс давал метакромазию при окраске толуидиновым синим, что указывает на наличие кислых гликозаминогликанов. Кроме того, во внутренних слоях регенерата имелись незрелые клетки типа хондробластов с небольшим ядром и с очень узкой или отсутствующей лакуной вокруг клеток (рис. 2, д). При этом поверхностный слой скорее принадлежал к фиброзному хрящу, так как матрикс в нем был фибриллярный. Внутри регенерата сохранялись единичные небольшие фрагменты разрушающихся викариловых волокон (рис. 2, е).

Заключение. Полученные результаты подтвердили адекватность используемой модели неполнослойного дефекта суставного хряща. Его размер, глубина, место моделирования (межмышечковая ямка) и срок наблюдения (4 мес) позволяют достоверно оценивать степень восстановления гиалинового хряща при использовании самых различных условий и факторов в качестве стимуляторов процессов регенерации. Во всех случаях применения для хондропластики ММСК, которые укладывали на дно дефекта и прикрывали испытуемым материалом, регистрировали явления, свидетельствующие о стимуляции процессов репаративной регенерации. Наилучшие результаты получены при использовании в качестве имплантата викриловой сетки: гиалиновым хрящом была замещена большая часть дефекта. Викриловая и желатиновая губки практически в 2 раза толще викриловой сетки, и поэтому значительно выступают над плоскостью суставной пластинки. Надколенник после возвращения на место сильно сдавливает имплантат, вследствие чего формируются неблагоприятные для клеток условия, и они гибнут. Викриловая сетка не выступает над хрящевой пластинкой, не сдавливает клетки и при этом медленно рассасывается: даже через 4 мес внутри хрящевого регенерата остаются ее фрагменты. За счет этого создаются более благоприятные условия для жизнедеятельности клеток. Возможно, имеются и другие объяснения полученным результатам, но это будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-25-00055) в части изучения возможности формирования хрящевой ткани с использованием ММСК и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 13-04-12032) в части исследования возможности восстановления гиалинового хряща суставов.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. Спонтанная и индуцированная дифференцировка костной ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки. Доклады АН СССР. 1969; 187 (2): 473-9

Сведения об авторах: Чайлахян Р.К. — доктор биол. наук, старший науч. сотр., рук. лаборатории НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; Шехтер А.Б. — доктор мед. наук, проф., зав. лабораторией экспериментальной морфологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; Тельпухов В.И. — доктор мед. наук, проф. кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; Иванников С.В. — доктор мед. наук, проф. кафедры травматологии и ортопедии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; Герасимов Ю.В. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; Воробьева Н.Н. — науч. сотр. Института проблем лазерных и информационных технологий РАН; Москвина И.Л. — науч. сотр. НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; Баграшвили В.Н. — доктор физ.-мат. наук, проф., зав. отделом лазерной атомно-молекулярной технологии Института проблем лазерных и информационных технологий РАН.

Для контактов: Чайлахян Рубен Карпович. 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18. Тел.: +7 (499) 193-61-02. E-mail: rubenchail@yandex.ru.

- [Chailakhyan R.K., Lalykina K.S. Spontaneous and induced differentiation of bone tissue in population of fibroblast-like cells derived from prolonged monolayer cultures of bone marrow and spleen. Reports of USSR Academy of Science. 1969; 187 (2): 473-9 (in Russian)].
- Friedenstein A.Y., Chailakhyan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinetics. 1970; 3: 393-403.
 - Friedenstein A.Y., Chailakhyan R.K., Gerasimov Yu.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Tissue Kinetics. 1987; 20: 263-72.
 - Smith G.D., Knutsen G., Richardson J.B. A clinical review of cartilage repair techniques J. Bone Joint Surg. Br. 2005; 87 (4): 445-9.
 - Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee autologous chondrocyte transplantation N. Engl. J. Med. 1994; 331 (14): 889-95.
 - Peterson L., Brittberg M., Kiviranta I., Akerlund E.L., Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. Am. J. Sports Med. 2002; 30 (1): 2-12.
 - Steinwachs M.R., Kreuz P.C. Clinical results of autologous chondrocyte transplantation (ACT) using a collagen membrane. In: Henrich C., Nitz U., Eulert J., eds. Cartilage surgery and future perspectives. Springer Berlin Heidelberg New York; 2003: 37-48.
 - Wood J.J., Malek M.A., Frassica F.J., Polder J.A., Mohan A.K., Bloom E.T. et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. Cote. J Bone Joint Surg. Am. 2006, 88 (3): 503-7.
 - Knutsen G., Engebretsen L., Ludvigsen T.C., Drogset J.O., Gruntvedt T., Solheim E. et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. J. Bone Joint Surg. Am. 2004; 86-A (3): 455-64.
 - Chen F.H., Rousche K.T., Tuan R.S. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2006; 2 (7): 373-2.
 - Uematsu K., Hattori K., Ishimoto Y., Yamauchi J., Habata T., Takakura Y. et al. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional polylactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. Biomaterials. 2005; 26(20): 4273-9.
 - Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., Saito M., Murata N., Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. Osteoarthritis Cartilage. 2002; 10 (3): 199-206.