

© Коллектив авторов, 2015

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОСТЕЗАМЕЩАЮЩЕЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ КАЛЬЦИЙФОСФАТНОЙ КЕРАМИКИ, АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ФИБРИНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ

В.Е. Мамонов, А.Г. Чемис, В.С. Комлев, А.Л. Берковский,  
Е.М. Голубев, Н.В. Проскурина, Н.В. Сац, Н.И. Дризе

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России,  
ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова» РАН, Москва, РФ

*В исследовании in vivo при заполнении критического костного дефекта мышечка бедренной кости кролика и при эктопической имплантации изучены биологические характеристики костезамещающей тканеинженерной конструкции (ТИК), которая включала гранулят пористой кальцийфосфатной керамики (КФК) фазового состава (трикальцийфосфат), фибриновый гидрогель и аутологичные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ауто-ММСК), индуцированные и неиндуцированные к остеогенной дифференцировке. Были определены следующие биологические характеристики данной ТИК: способность к переносу в своем составе жизнеспособных ауто-ММСК с сохранением их регенераторного потенциала; способность ауто-ММСК к неоостеогенезу только в условиях ортотопической имплантации; ауто-ММСК, индуцированные к остеодифференцировке, участвуют в репаративных процессах в течение не более 6 нед после имплантации; негативное влияние фибринового гидрогеля на остеоиндуктивные свойства КФК в составе ТИК. Показано, что для обеспечения остеогенеза в имплантированной ТИК, помимо наличия жизнеспособных ауто-ММСК, необходимо одновременное присутствие остеоиндуктивных и остеоиндуктивных факторов. Без соблюдения этих условий новообразования кости в критическом костном дефекте и при эктопической имплантации не происходит.*

**Ключевые слова:** костезамещающие технологии, тканеинженерные конструкции, кальцийфосфатная керамика, аутологичные мезенхимные стромальные клетки, фибриновый гидрогель.

### *Biologic Characteristics of Bone Substituting Tissue Engineering Construction Based on Calcium Phosphate Ceramics, Autologous Mesenchymal Stromal Cells and Fibrin Hydrogel*

V.E. Mamonov, A.G. Chemis, V.S. Komlev, A.L. Berkovskiy,  
E.M. Golubev, N.V. Proskurina, N.V. Sats, N.I. Drize

National Research Center for Hematology,  
Institute of Metallurgy and Material Science named after A.A. Baykov, Moscow, RF

*Biological characteristics of bone substituting tissue engineering construction (TEC) that contained porous calcium phosphate ceramic granulate (CPC) of phase structure ((tricalcium phosphate (TCP)), fibrin hydrogel and autologous multipotent mesenchymal stromal cells (auto-MMSC) induced and non-induced to osteogenic differentiation were studied in vivo. The following characteristics of TEC were determined: ability to transfer within its structure the viable auto-MMSC with preservation of their regeneration potential; ability to osteogenesis only under conditions of orthotopic implantation; ability of induced to osteogenic differentiation auto-MMSC to participate in the reparative processes for not more than within 6 weeks after implantation; negative affect of fibrin hydrogel on the osteoinductive properties of CPC within TCP structure. It was shown that to provide osteogenesis in the implanted TEC not only the viable auto-MMSC but simultaneous presence of osteoinductive and osteoconductive factors was required. No bone formation in a critical bone defect and in ectopic implantation takes place without observance of these conditions.*

**Key words:** bone substituting technologies, tissue engineering construction, calcium phosphate ceramics, autologous mesenchymal stromal cells, fibrin hydrogel.

**Введение.** Создание биоматериалов с остеогенными свойствами является актуальной задачей при органотипическом замещении критических костных дефектов [1–3]. Большие надежды в ее реше-

нии возлагают на использование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) в составе тканеинженерной конструкции на основе биоматериалов третьего поколения, которые, со-

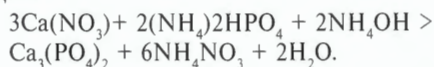
гласно классификации L. HenchL и J. Polak (2002), должны обеспечивать перенос и фиксацию в месте костного дефекта жизнеспособных ММСК с сохранением их регенеративного потенциала [4–7]. В большей степени этим характеристикам соответствуют композиционные биоматериалы на основе биогеля и неорганического субстрата [8–10]. Как правило, для этих целей используют пористую кальцийфосфатную керамику (КФК) на основе трикальцийфосфата (ТКФ), которая обладает остеокондуктивными свойствами [7, 11, 12].

Целью работы являлось исследование *in vivo* костезамещающего биоматериала, состоящего из пористой КФК фазового состава ТКФ, аутологичных ММСК (ауто-ММСК) и фибринового гидрогеля (ФГ). При создании данного биоматериала использовали компоненты отечественного производства: гранулят пористой резорбируемой КФК на основе ТКФ, высокоактивные, очищенные и вирусинактивированные препараты фибриногена и тромбина.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали взрослых кроликов породы «Советская шиншилла», самцы и самки массой 2,8–3,5 кг в возрасте 10–12 мес в начале эксперимента, которых доставляли из филиала «Белый мох» Научного центра биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в индивидуальных сетчатых клетках, они получали стандартный комбикорм из травяной муки и сочные корма. Эксперименты были одобрены комиссией по биомедицинской этике при институте медико-биологических проблем РАН (протокол № 257).

*Синтез порошка ТКФ.* Для получения порошка ТКФ был использован метод осаждения из растворов, основанный на осаждении из 0,5М раствора нитрата кальция  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  и 0,5М раствора фосфата аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Реакцию проводили при температуре 25°C. Значение pH = 7 реакционной смеси поддерживали добавлением  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Взаимодействие реагентов происходит по реакции:



В реакционный сосуд, снабженный механической мешалкой, помещали 0,5М раствор  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Затем медленно, при постоянном перемешивании по каплям добавляли 0,5М раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Осадок отфильтровывали, сушили в сушильном шкафу при температуре 100°C. Последующее прокалывание порошка проводили при температуре 700°C.

*Получение объемных керамических материалов.* Из полученной массы порошка готовили шликер: суспензию порошок/биополимер смешивали с водным раствором полиакриламида (ПАА) в соотношении порошок:вода:ПАА 1:1:1, полученным шликером пропитывали заготовки из ячеистой полимерной матрицы.

Обжиг формовок ТКФ проводили в силитовой печи сопротивления, в атмосфере воздуха, со скоростью нагрева по режиму: до 300°C за 30 мин без выдержки, до 600°C за 2,5 ч с последующей выдержкой в течение 30 мин, до 1300°C за 1,5 ч с выдержкой 2 ч (с целью выжигания органической составляющей, с сохранением целостной структуры керамики).

Охлаждение образцов до комнатной температуры проводили в выключенной печи. Для дальнейших экспериментов *in vivo* отбирали фракцию размером 250х50 мкм, которую подвергали стерилизации автоклавированием при температуре 180±50°C в течение 1 ч согласно МУ-287-113.

*Получение концентратов тромбина и фибриногена.* Препарат фибриногена получали из криопреципитата свежезамороженной плазмы доноров. Раствор криопреципитата обрабатывали гелем гидроксида алюминия, что снижало активность факторов протромбинового комплекса с 0,7 до 0,01 МЕ/мл и предотвращало активацию фибриногена в процессе дальнейшего выделения [13]. Фибриноген осаждали, добавляя полиэтиленгликоль до концентрации 2–3 г/л. Осадок растворяли в цитратном буфере до концентрации 25–30 г/л, поддерживая pH в диапазоне 7,5–8,0. В полученном растворе проводили инактивацию вирусов, добавляя Твин-80 и три-н-бутил фосфат до концентраций 1% и 0,03% соответственно. Процесс инактивации вирусов осуществляли при температуре 25°C в течение 6 ч. Вирусинактивирующие реагенты удаляли трехкратной экстракцией раствора фибриногена вазелиновым маслом. Затем фибриноген двукратно переосаждали, добавляя в раствор глицин до концентрации 1,5 М/л. Фибриноген выпадал в осадок, а большинство балластных белков удаляли. После переосаждения фибриноген растворяли в цитратном буфере до концентрации 25 г/л, фильтровали через стерилизующий фильтр, разливали во флаконы по 2 мл и лиофилизировали. Для получения раствора фибриногена к лиофилизированному концентрату фибриногена добавляли 2 мл дистиллированной воды для инъекций и помещивали на водяной бане при 37°C в течение 5 мин до полного растворения препарата.

Криосупернатант нативной плазмы (КСН) доноров использовали в качестве сырья для получения тромбина. Из КСН выделяли протромбиновый комплекс сорбцией на DEAE-Sephadex FF методом колоночной хроматографии или на DEAE-Sephadex A-50 методом хроматографии в объеме [14]. В результате получали раствор, содержащий 8–12 МЕ/мл протромбина. Для активации протромбина раствор диализовали для доведения концентрации хлорида натрия в нем до физиологического уровня 0,15 М, затем добавляли хлорид кальция и оставляли на 18 ч при перемешивании при температуре 10–15°C [15]. В процессе инкубации под действием ионов кальция и компонентов протромбинового комплекса проис-

ходила трансформация протромбина в активный тромбин, причем из 1 МЕ протромбина удалось получить 70–80 МЕ тромбина. В растворе тромбина проводили инактивацию вирусов в условиях, описанных выше. Очистку тромбина от продуктов вирусной инактивации и балластных белков проводили хроматографией на CM-Sepharose FF [16]. В результате был получен высокоочищенный тромбин с активностью 2–3 тыс. МЕ/мл. Полученный раствор разводили буфером для лиофилизации до активности тромбина около 500 МЕ/мл, добавляли для стабилизации человеческий альбумин до концентрации 10 г/л, стерильно фильтровали, разливали во флаконы по 1 мл и лиофилизовали. Для получения раствора тромбина к лиофилизированному концентрату тромбина добавляли 5 мл физиологического раствора.

*Получение, культивирование, индукция к остеогенной дифференцировке и маркирование ММСК кролика.* Для получения ауто-ММСК под футлярной новокаиновой блокадой 20 мл 0,5% раствора новокаина (ОАО «Органика») аспирировали костный мозг из дистальных мышечков бедренных костей кролика. Получали 1,5–2 мл костного мозга в пробирки с 500 Ед/мл гепарина («Sigma»).

Для выделения ядродержащих клеток костный мозг помещали в питательную среду  $\alpha$ MEM («ICN») с 0,1 % метилцеллюлозы (1500 сП, «Sigma») и оставляли на 40 мин при комнатной температуре. За это время большая часть эритроцитов и гранулоцитов оседала, а ядродержащие клетки оставались во взвеси. Надосадочную жидкость собирали и осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин. Количество ядерных клеток определяли при подсчете с генциан-виолетом (1% раствор на 3% уксусной кислоте). Среднее количество ядродержащих клеток составило  $22 \cdot 10^6$ . Затем клетки взвешивали в полной питательной среде  $\alpha$ MEM с 10% фетальной бычьей сыворотки («Hyclone»), 2 мМ L-глутамин («ICN»), 100 ед/мл пенициллина («Ферейн»), 50 мкг/мл стрептомицина («Ферейн») из расчета  $3 \cdot 10^6$  клеток на флакон с площадью дна 25 см<sup>2</sup>. После формирования конфлуэнтного монослоя клетки снимали 0,25% раствором трипсина, приготовленного на 0,02% EDTA («ICN») в физиологическом растворе («Sigma»), и рассаживали из расчета  $4 \cdot 10^3$  клеток на 1 см<sup>2</sup> поверхности дна флакона.

Остеогенную дифференцировку индуцировали добавлением 0,1 мкМ дексаметазона, 0,15 мМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты тринатриевой соли («Sigma») и 3 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> («Sigma») в среду для культивирования ММСК. Клетки культивировали в течение 2–5 дней. Для маркирования ММСК использовали лентивекторы третьего поколения LeGo, содержащие ген зеленого белка eGFP и красного белка Cherry (C2), с делетированным промотором. Вирусные стоки получали с помощью кальциевофосфатной трансфекции плазмид pHCMVC-

VSV-G (R861), pGpur(R1246), pMDLg/pRRE и pRSVRevv клетки PhoenixGP, любезно предоставленных проф. Б. Фейзе (B. Fehse; University Hospital Eppendorf, Гамбург). Вирусные частицы концентрировали в 100 раз путем центрифугирования в течение 3,5 ч при 18000 об/мин. Определенные титра вируса проводили на клетках линий 293T и PhoenixGP.

Для заражения ММСК лентивирусным вектором из флаконов полностью отбирали среду для культивирования и наносили на подслои вирусные частицы из расчета примерно  $3 \cdot 10^7$  на флакон с площадью дна 175 см<sup>2</sup> в 7 мл среды  $\alpha$ MEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 8 мкг/мл полибрена («Sigma»). Через 6 ч среду заменяли на 25 мл полной питательной среды. Заражению подвергали примерно 60% культивированных ММСК. Перед имплантацией ММСК снимали трипсином. Маркерные гены C2 или GFP использовали поочередно в популяции ММСК как индуцированных к остеогенной дифференцировке, так и не индуцированных для исключения влияния генетического маркера на регенеративную функцию культивированных ММСК.

*Получение ТИК на основе ФГ и ММСК.* Первый компонент двухкомпонентной системы получали при добавлении ауто-ММСК в количестве от 1 до  $19,8 \cdot 10^6$  (в среднем  $6,3 \cdot 10^6$ ), взвешенные в 0,5 мл питательной среды к 1 мл раствора фибриногена.

Второй компонент представлял собой раствор тромбина с активностью 50 Ед в объеме 0,5 мл.

Оба компонента системы можно было ввести через официальные медицинские иглы диаметром от 0,6 мм и более. При смешивании двух компонентов происходила полимеризация фибриногена, что способствовало фиксации ММСК в составе плотно-эластичного сгустка в полости костного дефекта.

*Получение ТИК на основе гранулята пористой КФК и ФГ.* В состав композиционного материала входили пористые гранулы КФК размером 250 мкм, общей пористостью 70%, (размер пор от 10 до 50 мкм).

Первый компонент системы получали следующим образом: в 1 мл раствора фибриногена помещали от  $3,4$  до  $9,9 \cdot 10^6$  ММСК в виде взвеси в 0,5 мл питательной среды. Далее к полученному объему добавляли 1 мл гранулята пористой КФК. Добавление керамических гранул в состав данного компонента ТИК делало невозможным инъекционное введение через стандартный медицинский шприц типа Luer.

После добавления к первому компоненту 50 Ед тромбина в 0,5 мл физиологического раствора получали плотно-эластичную субстанцию, которая могла быть малоинвазивно введена в костный дефект мышечка через тубус пластикового медицинского шприца. Пластичность материала позволяла полноценно заполнять полость костного дефекта сложной геометрической формы.

Эктопическая подкожная и ортотопическая имплантация в критический дефект спонгиозной кости (мышцелковая модель). Для профилактики инфекционных осложнений всем животным за 3 ч до операции вводили энрофлоксацин в дозе 10 мг/кг подкожно, затем в течение последующих 5 дней в той же дозе подкожно 1 раз в сутки.

В качестве модели критического дефекта губчатой кости использовали модель дефекта мышцелков бедренной кости. Всего выполнено 50 операций на 25 животных (использовали обе конечности). Операции проводили в асептических условиях под футлярной анестезией бедра, для чего использовали 20 мл 0,5 % раствора новокаина (ОАО «Органика», Россия). Из проекционного разреза длиной 2 см выделяли наружный мышцелок бедра. Сверлом диаметром 5 мм производили рассверливание наружного мышцелка бедренной кости в поперечном направлении на глубину 1–1,2 см до кортикальной пластинки внутреннего мышцелка. Костный дефект заполняли исследуемым биоматериалом. Рану послойно ушивали наглухо. Иммобилизацию конечности не выполняли.

Подкожную эктопическую имплантацию осуществляли из тех же доступов. Тупым путем формировали подкожный тоннель 4 см в проксимальном направлении. Биоматериал имплантировали в сформированный подкожный тоннель. Подкожную имплантацию осуществляли только для ТИК с КФК.

*Методы оценки полученных результатов.* Полноту заполнения костного дефекта, динамику костеобразования и резорбции керамических гранул оценивали рентгенологически. При выведении животных из эксперимента выполняли аутопсию с фотографированием цифровым фотоаппаратом. При использовании мышцелковой модели кролика выполняли поперечный срез в зоне рассверливания мышцелка. Оценивали органолептические характеристики, васкуляризацию, прочность материала в сравнении с окружающей костью, сращение материала со стенками костного дефекта.

Новообразование костной ткани, остеокондуктивные свойства КФК оценивали посредством гистологического исследования образцов биологических материалов. Полученные образцы фиксировали в формалине, декальцинировали, приготавливали срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином (по Романовскому — Гимзе) и по Ван Гизону. Выполняли микрофотограммы с увеличением 50, 100, 200 на световом микроскопе Leica DM LB.

Для ПЦР-анализа ДНК на наличие гена eGFP использовали праймеры EGFP-w1: 5'-ATGGTG-AGCAAGGGCGAGGA-3' (прямой) и EGFP-C1: 5'-AGACGTTGTGGCTGTTGTAG-3' (обратный), позволяющие синтезировать фрагмент длиной 454 пн. В качестве внутреннего контроля для подтверждения наличия и целостности анализируемой ДНК использовали праймеры, комплементарные гену Smc: SmcVD 5'-GAGAGGAGGATCTTGACCT-3'

(прямой) и SmcUR 5'-CACCGACGGTCCTTG-CAGAT-3' (обратный), позволяющие синтезировать фрагмент длиной 360 пн с копии гена, локализованной на X-хромосоме. Обе пары праймеров использовали в мультиплексном варианте в концентрации 0,5 мкМ каждого. Возможно также использование праймеров Smc в концентрации 0,125 мкМ. Полимеразную цепную реакцию проводили в 32–36 циклов в следующих условиях: денатурация 94°C — 1 мин, отжиг 62°C — 1 мин, синтез 72°C — 2 мин. Полученные фрагменты анализировали при помощи электрофореза в 2% агарозном геле.

Для ПЦР-анализа ДНК на наличие гена Cherry использовали праймеры Ch-com-R: 5'-CAC-ATA-GCG-TAA-AAG-GAG-CAA-C -3' (прямой) и Ch-D : 5'-ACC-CAG-GAC-TCC-TCC-CTG-CA -3' (обратный), позволяющие синтезировать фрагмент длиной 559 пар нуклеотидов. Полимеразную цепную реакцию проводили в 32 цикла в следующих условиях: денатурация 94°C — 1 мин, отжиг 64°C — 1 мин, синтез 72°C — 2 мин. Полученные фрагменты анализировали по электрофоретической подвижности в 2% агарозном геле.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах *in vivo* на модели критического дефекта губчатой кости мышцелков бедра кролика была изучена способность ФГ переносить в своем составе в очаг критического костного дефекта культивированные ауто-ММСК. Их жизнеспособность в составе ТИК подтверждена данными ПЦР-анализа, выявившего наличие маркерного гена в регенерирующих тканях в различные сроки после имплантации (табл. 1).

По данным аутопсии и визуальной оценки не отмечено полноценного восстановления кости в полости критического дефекта мышцелков бедра кролика ни в одном случае введения ауто-ММСК в очаг критического костного дефекта, который замещался тканью жирового костного мозга независимо от индукции ауто-ММСК к остеогенной дифференцировке (рис. 1). На микроскопическом уровне остеогенез не был выявлен также и в образцах, в которых определяли наличие генетической метки культивированных ауто-ММСК (см. табл. 1). Таким образом, отсутствие остеокондуктивного компонента в полости костного дефекта не позволило осуществить восстановление костной структуры, даже при наличии остеоиндуктивных и остеогенных компонентов.

Добавление гранулята КФК в состав ТИК способствовало восстановлению костной ткани в критическом дефекте губчатой кости (рис. 2, 3). При использовании генетического маркера показано, что потомки маркированных ауто-ММСК выявлялись посредством ПЦР в регенерирующих тканях даже через 12 мес после имплантации (см. табл. 1). Процессы неоosteогенеза внутри ТИК происходили только в случае присутствия в регенерирующих тканях меченных ауто-ММСК, не-

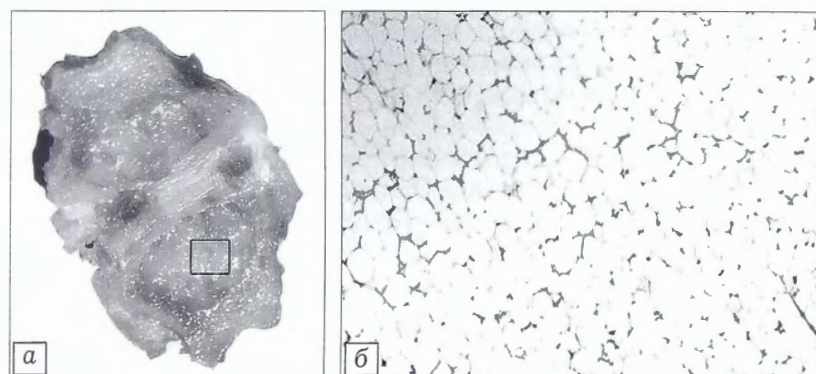
**Табл. 1.** Новообразование кости и выявление генетической метки в ТИК на основе ФГ при ортотопической и эктопической имплантации

Срок наблюдения	Наличие маркера		Новообразование кости в составе ТИК			Наличие маркера		
	C2	GFP	ФГ-КФК-ММСК подкожно	ФГ-КФК-ММСК костный дефект	ФГ-ММСК костный дефект	ФГ-КФК-ММСК подкожно	ФГ-КФК-ММСК костный дефект	ФГ-ММСК костный дефект
2 нед	NA	+ osteo	-	++	NA	GFP -/+	GFP +/+	NA
	+ osteo	+	-	++	NA	GFP -/+ C2 -/-	GFP +/- C2 +/-	NA
6 нед	+	NA	-	++	NA	C2 +/+	C2 +/+	NA
	+	+ osteo	-	++	NA	GFP +/+ C2 +/-	GFP -/- C2 -/+	NA
	+	+ osteo	-	-	NA	GFP -/- C2 +/-	GFP -/- C2 -/-	NA
	+ osteo	NA	-	+	NA	C2 +/+	C2 +/-	NA
	+ osteo	+	NA	NA	-	NA	NA	GFP -/- C2 -/-
	+ osteo	+	NA	NA	-	NA	NA	GFP +/+ C2 +/+
3 мес	NA	+	-	-	NA	GFP -	GFP -/-	NA
	+	+ osteo	-	++	NA	GFP -/- C2 -/-	GFP -/- C2 -/-	NA
	+ osteo	NA	-	++	NA	C2 -/-	C2 -/-	NA
	+ osteo	+	NA	NA	-	NA	NA	GFP -/- C2 -/+
	+ osteo	+	NA	NA	-	NA	NA	GFP -/- C2 -/+
	+ osteo	+	NA	NA	-	NA	NA	GFP +/+ C2 +/+
12 мес	+	NA	-	-	NA	C2 -/-	C2 -/-	NA
	+ osteo	+	-	++	NA	GFP +/- C2 -/-	GFP +/+ C2 -/-	NA
	+ osteo	+	-	+	NA	GFP -/- C2 -/-	GFP +/- C2 +/-	NA

Примечание. osteo — наличие маркера в ММСК, индуцированных к остеогенной дифференцировке; «++» — полноценное восстановление кости, определяемое макроскопически; «+» — новообразование кости определяется при гистологическом исследовании; «-» — нет признаков новообразования кости внутри биоматериала; NA — данное исследование не применялось; x/x — наличие метки в одном из образцов на одной из конечностей (в эксперименте использовали обе конечности кролика).

зависимо от индукции их к остеогенной дифференцировке (см. табл. 1, рис. 3). Маркированные

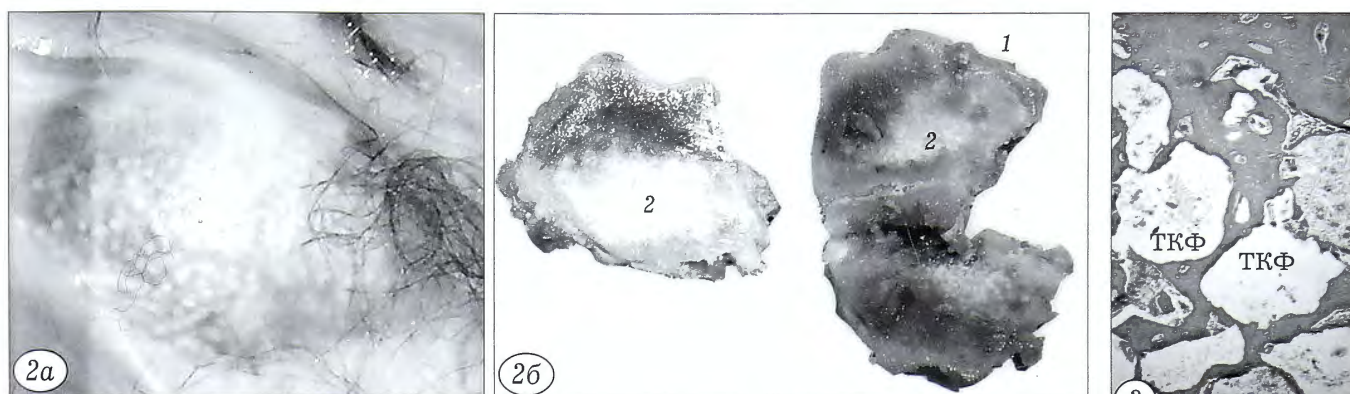
клетки в регенерирующих тканях не выявлялись в трети случаев, когда не было отмечено восстановления костной ткани в дефекте.



**Рис. 1.** Поперечный срез через мышелки бедренной кости кролика через 12 нед после заполнения критического костного дефекта ТИК на основе ФГ и культивированных ауто-ММСК. Макропрепарат (а) и гистологический препарат (б, окраска гематоксилином и эозином, х5). Костный дефект заполнен студенистой массой, представленной жировой тканью.

Как и во всех вариантах бесклеточного контроля, гранулы КФК в составе биоматериала были окружены фиброзной тканью. Процессы остеогенеза определялись только в месте непосредственного контакта гранул КФК со стенками костного дефекта.

Процессы неоosteогенеза в ТИК происходили только при ее ортотопической имплантации в свежесформированный костный дефект, когда в зоне дефекта присутствует большое количество остеиндуктивных факторов, провоспалительных цитокинов и факторов роста. При критических размерах дефекта собственных ресурсов для восстановления костной ткани недостаточно, что



**Рис. 2.** Поперечный срез через мышелки бедренной кости и подкожно расположенный ТИК на основе КФК–ФГ и культивированных ауто-ММСК через 6 нед после имплантации подкожно (а) и в зону критического костного дефекта (б).

1 — зона рассверливания, закрытая кортикальной пластинкой; 2 — гранулы КФК в костном регенерате.

Определяется интеграция ТИК со стенками костного дефекта.

**Рис. 3.** Поперечный срез через мышелки бедренной кости кролика через 6 нед после заполнения критического костного дефекта ТИК на основе КФК–ФГ и культивированных ауто-ММСК. Окраска гематоксилином и эозином. x10.

Новообразование кости внутри материала, непосредственно на поверхности керамического материала.

было отчетливо видно в контрольных образцах. Использование ТИК повышало остеогенный потенциал в зоне дефекта. Ауто-ММСК в составе ТИК, независимо от предварительной индукции к остеогенной дифференцировке, полноценно участвовали в остеогенезе (табл. 2). В присутствии ауто-ММСК остеогенез отмечали не только внутри костного дефекта, но и в виде костно-хрящевое регенерата в месте рассверливания (остеоперфорации) кортикальной пластинки, через которое ТИК вводили в костный дефект (рис. 4).

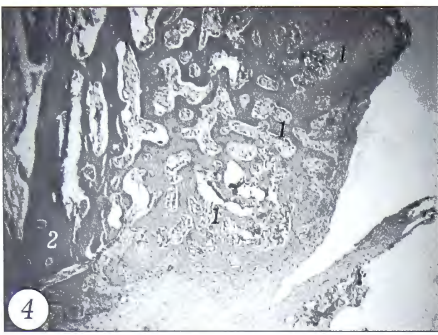
При эктопической имплантации мы наблюдали прорастание ТИК фиброзной тканью независимо от наличия ауто-ММСК, предварительно индуцированных к остеогенной дифференцировке (см. табл. 1, 2, рис. 5). Этот факт исключает наличие остеоиндуктивных факторов внутри ТИК,

опровергая, таким образом, некоторые данные литературы [3, 17, 18].

Как показано в табл. 1, ауто-ММСК, индуцированные к остеодифференцировке (генетическая метка С2), наблюдали на сроках не более 6 нед после операции, не индуцированные к остеодифференцировке клетки выявляли в вариантах эктопической и ортотопической имплантации через 3 и 12 мес. Отсутствие индуцированных к остеодифференцировке ауто-ММСК на поздних сроках после имплантации указывает на то, что подобные клетки, в отличие от более ранних клеток-предшественников, из которых в основном состоит популяция ММСК, со временем исчерпывают свой регенеративный потенциал и не участвуют в процессах восстановления и ремоделирования новообразованной кости в дефекте.

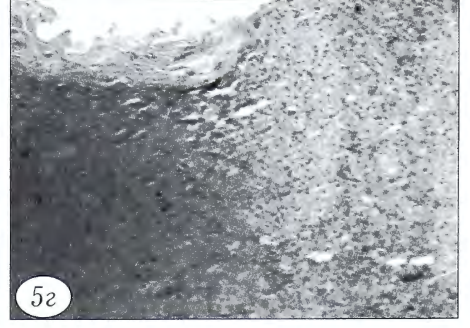
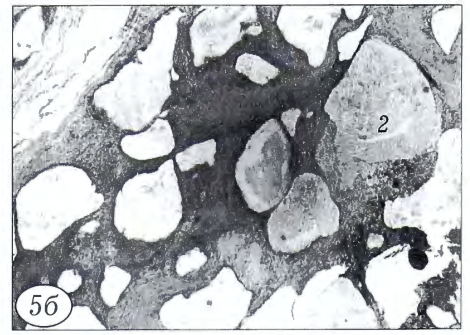
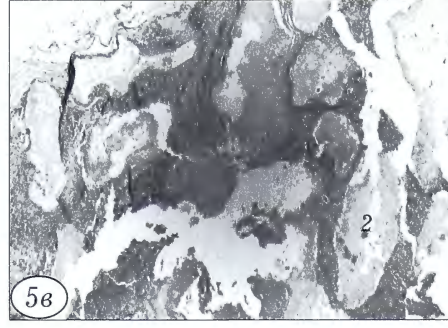
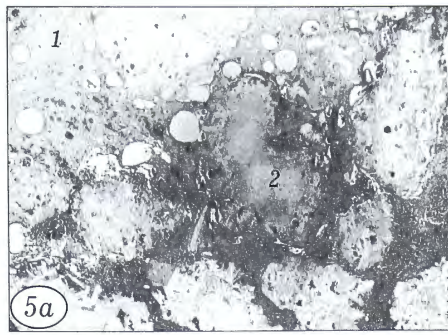
**Табл. 2.** Новообразование кости при использовании различных моделей *in vivo*

Модель	Биологическая характеристика модели				Новообразование кости
	остео-кондуктор	«остеогенные» элементы — культивированные ММСК	тканевой кондуктор — ФГ	остеоиндукторы костной ткани + собственные «остеогенные» элементы	
Мышечковая модель:					
заполнение ФГ–КФК–ММСК	+	+	+	+	+
заполнение ФГ–КФК	+	–	+	+	+
заполнение ФГ–ММСК	–	+	+	+	–
заполнение КФК (ТКФ)	+	–	–	+	+
без заполнения	–	–	–	+	–
Подкожная имплантация ФГ–КФК–ММСК	+	+	+	–	–



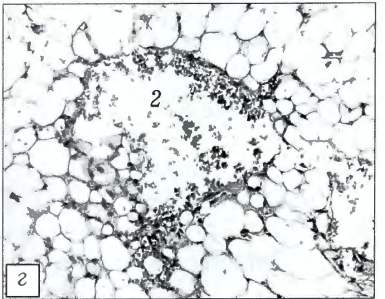
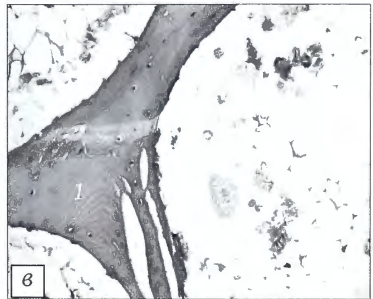
**Рис. 4.** Костно-хрящевой регенерат в зоне остеоперфорации кортикальной пластинки наружного мыщелка бедренной кости кролика через 2 нед после заполнения критического костного дефекта ТИК на основе КФК-ФГ и культивированных ауто-ММСК. Окраска гематоксилином и эозином. х 5.

1 — костно-хрящевой регенерат в зоне остеоперфорации; 2 — край кортикальной пластинки в области остеоперфорации.



**Рис. 5.** Гистологические препараты ТИК на основе КФК-ФГ и культивированных ауто-ММСК через 2 нед (а), 6 нед (б), 12 нед (в) и 12 мес (г) после эктопической (подкожной) имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. х5.

1 — нерезорбированный и не проросший соединительной тканью фибрин (компонент ТИК); 2 — гранулы КФК.



**Рис. 6.** Поперечный срез через мыщелки бедренной кости кролика через 12 мес после заполнения критического костного дефекта ТИК на основе ТКФ-ФГ и культивированных ауто-ММСК. Макропрепарат (а) и гистологические препараты (б-г, окраска гематоксилином и эозином, б — х5, в, г — х20).

а — новообразование кости на месте критического костного дефекта, гранулы ТКФ визуально практически не определяются. 1 — полноценное восстановление костных балок; 2 — единичные, полностью не резорбированные гранулы ТКФ в жировом костном мозге.

Анализ биологических характеристик ТИК с включением КФК показал, что новообразование костных балок происходило непосредственно на поверхности керамических гранул ТКФ в составе ТИК, в зоне их контакта со стенками костного дефекта, а также при непосредственном заполнении костного дефекта гранулятом КФК. Гранулы КФК подвергались практически полной резорбции через 12 мес после имплантации (рис. 5, 6).

**Заключение.** Результаты исследования позволяют сделать вывод о неоднозначной роли ФГ в составе композиционного костезамещающего биоматериала. С одной стороны, он способствует переносу в составе ТИК культивированных ауто-ММСК в очаг костного дефекта, сохраняя их жизнеспособность и регенеративный потенциал. С другой стороны, быстрое прорастание биоматериала соединительной тканью приводит к образованию на поверхности гранул КФК фиброз-

ной капсулы, которая значительно снижает либо полностью блокирует его остеокондуктивный потенциал.

Однозначно показана необходимость присутствия резорбируемой КФК в составе костезамещающей ТИК. Кроме того, для обеспечения неостеогенеза в свежесформированном дефекте губчатой кости достаточно остеокондуктивных свойств гранулята пористой КФК на основе ТКФ.

Ауто-ММСК, индуцированные к остеодифференцировке, в составе ТИК проявляли свой остеогенный потенциал на сроках до 12 нед. Дальнейшие репаративные процессы в костном дефекте происходили без их участия. Ауто-ММСК в составе ТИК при эктопической имплантации не проявляют свои остеогенные свойства вне зависимости от индукции к остеодифференцировке.

Таким образом, необходимым условием, обеспечивающим остеогенез в имплантированной ТИК,

является одновременное присутствие остеоиндуктивных и остеокондуктивных факторов. Без соблюдения этих условий новообразования кости как в критическом костном дефекте, так и при эктопической имплантации не происходит.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-04-12025 офи\_м*

**Благодарности:** сотрудникам патологоанатомического отделения (зав. — доктор биол. наук А.М. Ковригина), сотрудникам отделения рентгенорадиологии (зав. — канд. мед. наук И.Э. Костина) ФГБУ ГНЦ Минздрава России.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Goshima K., Nakase J., Xu Q., Matsumoto K., Tsuchiya H. Repair of segmental bone defects in rabbit tibia promoted by a complex of b-tricalcium phosphate and hepatocyte growth factor. *J. Orthop. Sci.* 2012; 17: 639–48.
- Mastrogiacomo M., Muraglia A., Komlev V., Peyrin F., Rustichelli F., Crovace A., Cancedda R. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod. Craniofacial. Res.* 2005; 8: 277–84.
- Scott M.A., Levi B., Askarinam A., Nguyen A., Rackohn T., Ting K. et al. Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev.* 2012; 21 (5): 655–67.
- Hench L.L., Polak J.M. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002; 295 (5557): 1014–7.
- Jiang B., Akar B., Waller T.M., Larson J.C., Appel A.A., Brey E.M. Design of a composite biomaterial system for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2014; 10 (3): 1177–86.
- Shao X., Goh J.C., Huttmacher D.W., Lee E.H., Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Engineering.* 2006; 12 (6): 1539–51.
- Wu H., Kang N., Wang Q., Dong P., Lv X., Cao Y., Xiao R. The dose-effect relationship between the seeding quantity of human marrow mesenchymal stem cells and in vivo tissue engineered bone yield. *Cell Transplant.* 2015; 24 (10): 1957–68. doi: 10.3727/096368914X685393.
- Breidenbach A.P., Dymont N.A., Lu Y., Rao M., Shearn J.T., Rowe D.W. et al. Fibrin gels exhibit improved biological, structural, and mechanical properties compared with collagen gels in cell-based tendon tissue-engineered constructs. *Tissue Eng. Part A.* 2015; 21 (3–4): 438–450.
- Carmagnola D., Berglundh T., Lindhe J. The effect of a fibrin glue on the integration of Bio-OssA with bone tissue. An experimental study in labrador dogs. *J. Clin. Periodontol.* 2002; 29: 377–83.
- Weinand C., Pomerantseva I., Neville C.M., Gupta R., Weinberg E., Madisch I. et al. Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone.* 2006; 38 (4): 555–63.
- Dorozhkin S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials.* 2010; 31 (7): 1465–85.
- Horowitz R.A., Mazor Z., Foitzik C. Beta-tricalcium phosphate as bone substitute material: properties and clinical applications. *Titanium.* 2009; 1 (2): 1–11.
- Meidler R., Raver-Shapira N., Bar L., Belyaev O., Nur I. Method for removing a lytic enzyme from a heterogeneous mixture. WO 2013001524 A1; 2011.
- Aizawa P., Winge S., Karlsson G. Large-scale preparation of thrombin from human plasma. *Thromb. Res.* 2008; 122 (4): 560–7.
- Jorquera N.J.I., Ristol D.P., Fernandez R.J., Brava C.I., Lopez G.R. Stable thrombin composition. EP 1649867 A1; 2004.
- Hanada S., Honda Y., Morisada Y., Miyake S., Matsumoto I. Process for producing thrombin. US 5945103 A; 1994.
- Barradas A.M.C., Yuan H., van Blitterswijk C.A., Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur. Cells Mater.* 2011; 21: 407–49.
- Song G., Habibovic P., Bao C., Hua J., van Blitterswijk C.A., Yuan H. et al. The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. *Biomaterials.* 2013; 34 (2013): 2167–76.

**Сведения об авторах:** Мамонов В.Е. — канд. мед. наук, зав. научно-клиническим отделением гематологической ортопедии ГНЦ; Чемис А.Г. — канд. мед. наук, старший науч. сотр. того же отделения; Комлев В.С. — доктор техн. наук, вед. науч. сотр. лаборатории керамических композиционных материалов ИМЕТ РАН; Берковский А.Л. — канд. биол. наук, зав. лабораторией фракционирования белков плазмы крови; Голубев Е.М. — зав. опытным производством глубокой переработки плазмы крови ГНЦ; Проскурина Н.В. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. лаборатории физиологии кроветворения ГНЦ; Сац Н.В. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. лаборатории физиологии и кроветворения ГНЦ; Дризе Н.И. — доктор биол. наук, зав. лабораторией физиологии кроветворения ГНЦ.  
**Для контактов:** Мамонов Василий Евгеньевич. 125167, Москва, Новый Зыковский пр., д. 4, ГНЦ. Тел.: +7 (903) 165–74–44. E-mail: vasily-mamonov@yandex.ru.