

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА
CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 616.718.41-089.843:616.419-018.4
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-7-19>

Поступила в редакцию 05.08.2019
Received 05.08.2019

А. Э. Мурзич¹, Л. А. Пашкевич¹, А. А. Жерносеченко²

¹Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СПОСОБА АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ
ТКАНИ ГОЛОВКИ БЕДРА**

Аннотация. Представлены результаты экспериментальной работы по обоснованию нового способа восстановления костной ткани головки бедренной кости с помощью мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Проведены оперативные вмешательства на 5 собаках, включающие эксфузию костного мозга, получение МСК и их последующую остеогенную дифференцировку, подбор носителя для МСК, создание дефектов головки бедра, имплантацию клеточного продукта в дефект кости. После операций осуществляли наблюдение и уход за экспериментальными животными, а затем выводили их из эксперимента и производили забор биологического материала. Результаты гистологического исследования микропрепаратов головок бедренных костей собак подтверждают образование зрелой костной ткани компактного строения с остеобластами на месте введения МСК. В экспериментальных образцах контрольной группы (без введения МСК) место дефекта выполнено грубоволокнистой остеобластической тканью без формирования костных структур.

Полученный экспериментальный материал позволит разработать метод аутотрансплантации МСК для регенеративного восстановления поврежденной костной ткани при остеонекрозе головки бедра у взрослых, который будет внедрен в систему практического здравоохранения.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, остеогенная дифференцировка, фибриновый гель, остеонекроз головки бедра, эксперимент

Для цитирования: Мурзич, А. Э. Экспериментальное обоснование способа аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток для регенерации костной ткани головки бедра / А. Э. Мурзич, Л. А. Пашкевич, А. А. Жерносеченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 7–19. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-7-19>

Alyaksandr E. Murzich¹, Lyudmila A. Pashkevich¹, Hanna A. Zhernasechanka²

¹Republican Scientific and Practical Centre of Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus

**EXPERIMENTAL JUSTIFICATION OF THE METHOD OF MESENCHYMAL STEM CELL
AUTOTRANSPLANTATION FOR REGENERATION OF THE FEMORAL HEAD BONE TISSUE**

Abstract. The results of experimental justification of a new method for restoring the femoral head bone tissue with the use of mesenchymal stem cells (MSCs) are presented. Surgical interventions were performed on 5 dogs, including the bone marrow exsuffusion, the obtaining of MSCs and their subsequent osteogenic differentiation, the selection of a carrier for MSCs, the creation of femoral head defects, and the implantation of a cellular product into a bone defect. Experimental animals were observed and cared after operations, and removed from the experiment, as well as the biological material was taken. The histological results of the femoral head micropreparations of dogs confirm the formation of the mature bone tissue of compact structure with osteoblasts at the site of MSCs injection. In the control group of the experimental samples (without MSCs), the defect was made by the fibrous and osteoblastic tissue without the formation of bone structures.

The obtained experimental material will allow us to develop a method for autologous transplantation of MSCs for regenerative restoration of bone tissue damage in the adult's femoral head osteonecrosis, which will find use in the practical healthcare system.

Keywords: mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, fibrin gel, femoral head osteonecrosis, experiment

For citation: Murzich A. E., Pashkevich L. A., Zhernasechanka H. A. Experimental justification of the method of mesenchymal stem cell autotransplantation for regeneration of the femoral head bone tissue. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 7–19 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-7-19>

Введение. Некроз головки бедренной кости (НГБК) является тяжелой формой патологии тазобедренного сустава с неблагоприятным течением, поскольку встречается, как правило, у лиц молодого возраста (25–44 года), быстро прогрессирует (в большинстве случаев отмечается двухсторонняя локализация процесса) и грозит последующей инвалидизацией. Начавшийся остеонекроз приводит в конечном итоге к коллапсу нагруженной части головки бедра, разрушению ее хряща, вторичному поражению вертлужной впадины и развитию коксартроза.

Среди методов лечения заболевания на ранних стадиях описаны способы хирургической декомпрессии зоны метаэпифиза бедра, восстановления некроза с помощью костных трансплантатов, костного цемента, деминерализованного костного матрикса, препаратов на основе фосфата кальция [1]. Основанием для применения трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при остеонекрозе являются данные о снижении числа клеток, предшественников остеоцитов, в интактной части головки бедренной кости, примыкающей к области некроза, которые при экзогенной стимуляции участвуют в восстановлении костной ткани [2].

Источником МСК могут быть различные ткани организма – костный мозг (КМ), жировая ткань, губчатая кость, синовиальная мембрана, скелетная мышца [3]. Тем не менее одними из самых доступных и востребованных в практической медицине остаются МСК, выделенные из КМ, который у взрослого человека содержит 1–2 МСК на $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ ядродержащих клеток. Стволовая природа этих клеток подтверждается их способностью к самовоспроизведению и дифференцировке, а их высокий пролиферативный потенциал позволяет приумножить популяцию в 1 млн раз [4].

Важным феноменом МСК костномозгового происхождения, делающим эти клетки идеальными для репарации костной и хрящевой тканей, является экспрессия основного конституционного гена коллагена 1-го типа (COL-1) – маркера остеогенной дифференцировки и коллагена 2-го и 10-го типов (COL-2 и COL-10) – маркеров хондрогенной дифференцировки. По данным Р. А. Conger с соавт. [5], только 5–15 % МСК после экспансии *in vitro* являются недифференцированными, в то время как остальные мультипотентные клетки коммитированы в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении, причем первой теряется способность дифференцироваться в жировые клетки, а потенциал к остео/хондрогенной дифференцировке остается у 60–80 % первичных клонов МСК КМ человека.

МСК КМ обладают следующими преимуществами для использования в качестве стимулятора регенерации костной ткани: доступность источника МСК, высокий пролиферативный потенциал, высокая пластичность клеток с направленностью к дифференцировке в остеогенном направлении; отсутствие иммуногенности, хоуминг МСК к месту повреждения; паракринный эффект МСК [6–8].

Проведенный анализ результатов научных работ по применению МСК для регенерации костной ткани показал, что в клинической практике с этой целью используют недифференцированные МСК костномозгового происхождения. Основанием является то, что МСК КМ, являясь предшественниками остеобластов, после локальной имплантации в зону костного дефекта подвергаются эндогенному воздействию молекул микроокружения, стимулирующих остеогенез [9]. Так, D. Zhao с соавт. [10] доказали безопасность и эффективность введения недифференцированных аутологичных МСК в дозе $2 \cdot 10^6$ клеток в 2 мл NaCl через декомпрессионный тоннель в область некроза у 50 пациентов с ранней стадией НГБК. Т. Аоуама с соавт. [11] у 9 пациентов с НГБК применил аутологичные МСК в носителе β -трикальцийфосфат в дозе $(0,5-1,5) \cdot 10^8$ для заполнения зоны некроза после кюретажа. К. Kawate с соавт. [12] на-

блюдали регенерацию костной ткани после имплантации остеогенно дифференцированных МСК на носителе из β -трикальцийфосфата. Однако при анализе этих работ остается спорным вопрос: что же оказало влияние на регенерацию костной ткани – МСК или β -трикальцийфосфат.

Подбор условий для осуществления дифференцировки МСК в остеобласты проводился многими научными группами. Сравнение эффективности остеодифференцировки МСК при различных условиях культивирования, согласно опубликованным материалам исследований, показало, что остеогенный потенциал МСК повышают: определенный уровень кислорода при культивировании (21 %) [13], присутствие в среде эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), использование в качестве стимуляторов остеодифференцировки дексаметазона, β -глицеролфосфата, аскорбиновой кислоты [14]. Для дифференцировки МСК в остеогенном направлении в качестве фактора иногда используют костный морфогенетический белок BMP (bone morphogenetic protein) [15].

Экспериментальные исследования применения клеточных технологий в ортопедии немногочисленны. А. Lebouvier с соавт. [15] в эксперименте на свиньях показали эффективность разработанного авторами метода лечения НГБК путем инъекции МСК чрескожно внутрикостно в головку бедра. Анализ биораспределения МСК показал заживление костной ткани через 9 недель. Z. Yan с соавт. [16] установили, что трансплантированные МСК могут выживать, размножаться и дифференцироваться непосредственно в остеобласты, что способствует ускоренному процессу восстановления.

Лечение НГБК с использованием клеточных технологий в странах Европы и США является новым направлением современной медицины. Одними из первых его стали применять Р. Hernigou с соавт. (Франция) [17]. Авторы перкутанно вводили концентрат МСК в очаг некроза головки бедра. Их стратегия была обусловлена предположением, что введенные стволовые клетки могут заселить трабекулярную структуру костной ткани, а затем оживить и реконструировать некротическую кость. Другие авторы, из клиники Mayo (США), получили положительные клинические результаты лечения после проведения 73 операций с применением core декомпрессии и концентрата клеток КМ [18].

Несмотря на активно ведущиеся исследования, в настоящее время не существует оптимального протокола получения биотрансплантата МСК для клинического применения с целью регенерации костной ткани, а в доступных печатных источниках отсутствует подробное описание хирургических способов имплантации МСК. В связи с вышеизложенным разработка принципиально иного лечебного подхода с использованием метода аутотрансплантации МСК имеет несомненную научную новизну и практическую значимость. Экспериментальная оценка безопасности и эффективности применения МСК в лечении НГБК является основой для внедрения данной методики в клиническую практику.

Цель исследования – подбор оптимальных условий экспансии и *in vitro* дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и оценка эффективности нового метода аутотрансплантации этих клеток для регенеративного восстановления повреждений костной ткани в экспериментах на животных.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на основании положительного решения Ученого совета и с разрешения комитета по этике Республиканского научно-практического центра травматологии и ортопедии (РНПЦ ТО). Экспериментальная работа выполнена на базе отдела общей патологии научно-исследовательской лаборатории государственного учреждения «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО) в стандартных условиях операционной вивария. Эксперименты проведены на 5 беспородных собаках обоего пола (10 тазобедренных суставов) массой 14,7 [13; 16,3] кг. При проведении экспериментальных исследований руководствовались требованиями, установленными инструкцией ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», СОП 03 ПО 144-2016, СОП 03 ПУ 160-2016, СанПиН 2.1.2.12-18-2006. Основные этапы эксперимента приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Этапы выполнения эксперимента

Table 1. Experiment stages

Этап	Длительность этапа	Исполнители
Нахождение животных в карантине	2 недели	БелМАПО
Эксфузия костного мозга	1 неделя	БелМАПО, РНПЦ ТО
Выделение МСК из костного мозга, экспансия клеток и их остеодифференцировка, создание композита МСК в системе с носителем	4 недели	РНПЦ ДОГИ
Введение биомедицинского клеточного продукта МСК животным, создание контрольной группы	1–2 недели	БелМАПО, РНПЦ ТО
Наблюдение за животными	3–6 мес.	БелМАПО, РНПЦ ТО
Вывод животных из эксперимента, гистологическое исследование препаратов	2 мес.	БелМАПО, РНПЦ ТО

Эксфузия костного мозга у экспериментальных животных для получения МСК. Хирургические вмешательства по забору КМ и по моделированию травмы головки бедренной кости осуществляли под комбинированной анестезией в соответствии с разработанной моделью эксперимента. Пункцию КМ выполняли под наркозом в асептических условиях операционной после бритья животного и обработки операционного поля антисептиками. Обезболивание осуществляли посредством внутримышечного введения раствора кетамина (5 %), смеси фентанила (0,05 %) и дроперидола (0,25 %).

Для эксфузии КМ животное укладывали на бок и фиксировали на операционном столе для больших лабораторных животных. После соответствующей подготовки операционного поля (5 %-ным спиртовым раствором йода) обеспечивали доступ к подвздошной кости. Взятие материала осуществляли в области гребня подвздошной кости.

Пункцию выполняли с использованием шприца и пункционной иглы. Производили прокол кожи, затем вращательными движениями иглы преодолевали кортикальный слой до ощущения провала, после чего аспирировали КМ. Последний вводили в стерильную пробирку Vacu Lab, содержащую Sodium heparin. Полученный КМ транспортировали в Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦ ДОГИ).

Формирование дефектов костной ткани головки бедра собак (контрольная группа). Данный этап эксперимента выполняли одновременно с пункцией КМ под наркозом в асептических условиях операционной. Подготовка включала бритье животного, обработку операционного поля антисептиками, обкладывание стерильным бельем. В вертельной области бедра собаки выполняли разрез кожи (длиной 3 см), клетчатки, мышц. Пальпаторно определяли шейку бедра. Под контролем пальца в шейку по направлению к головке вводили спицу Киришнера, по которой с помощью канюлированного бора далее формировали дефект в шейке и головке бедра, осуществляя таким образом механическую деструкцию передневерхней части головки (5 головок бедер). Размер дефекта составлял 10 мм в диаметре, 20–30 мм в длину. В контрольной группе (5 головок бедер) после формирования дефектов очаги деструкции оставляли незаполненными (4 головки), в одном случае очаг заполняли фибриновым гелем без МСК. Рану промывали и ушивали послойно, кожу обрабатывали антисептиками.

Получение МСК из костного мозга собак. КМ собак доставляли из операционной в специализированную лабораторию клеточных биотехнологий и цитотерапии РНПЦ ДОГИ. Изготовление клеточного продукта МСК включало следующие этапы:

выделение фракции МНК из костного мозга в градиенте плотности раствора Гистопак-1077 путем наслоения костного мозга на Гистопак-1077 (соотношение 3:1) и последующего центрифугирования при 200 g в течение 30 мин;

отмывку выделенных МНК в среде IMDM с последующим центрифугированием при 400 g в течение 10 мин;

культивирование МНК в концентрации $50 \cdot 10^6$ в полной среде IMDM с добавлением 10 %-ной ЭТС во флаконах для культивирования при 37 °C и 5 % CO₂ во влажной атмосфере и выделение МСК собаки методом адгезии клеток к пластиковой поверхности флакона;

экспансію МСК собаки путем проведения двух пассажей;
снятие клеток с поверхности флакона раствором 0,25 %-ного трипсин-ЭДТА, отмывку клеток раствором 0,9 %-ного NaCl и идентификацию по морфологическим признакам полученных в культуре МСК.

Клеточный продукт недифференцированных МСК был получен для всех 5 животных. Основные характеристики по выделению и культивированию МСК приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. **Параметры получения недифференцированных МСК из КМ собак**
T a b l e 2. **Parameters for obtaining undifferentiated MSCs from the dog's bone marrow**

№ животного	Объем КМ, мл	Срок культивирования, сут	К-во МСК на выходе, $\times 10^6$
1	10	53	12
2	10	53	12
3	18	24	19
4	9	24	30
5	9	24	34

Как видно из представленных данных, при эксфузии в среднем 11,2 [7,8; 14,5] мл КМ у собак можно в течение в среднем 35,6 [21,7; 49,5] сут экспансии клеток в культуре получить 21,4 [12,5; 30,3]·10⁶ МСК. При проведении анализа на стерильность полученного клеточного материала бактериальной контаминации не обнаружено. Все клетки морфологически соответствовали МСК и имели веретенообразную форму при адгезии на пластике.

Создание композита МСК в фибриновом геле для заполнения дефекта кости собаки. Данный этап эксперимента включал следующие этапы:

получение фибринового геля путем смешивания 5 U/мл тромбина с 10 мг/мл разведенного фибриногена и с 0,1 %-ным раствором аprotенина в объемах, необходимых для заполнения дефекта кости;

заселение (10–30)·10⁶ МСК в свежеприготовленный фибриновый гель и добавление к композиту МСК дифференциальной среды, содержащей 5 % альбумина, 10 мМ глицерол-2-фостата, 1 % антибиотика, 50 μ M L-аскорбиновой кислоты, 100 нМ дексаметазона в DMEM;

культивирование клеток в CO₂-инкубаторе при 37 °C, 5 % CO₂ и 90 % влажности в течение 4–5 сут;

отмывку трансплантата от культуральной среды в 0,9 %-ном NaCl.

После направленной остеогенной дифференцировки МСК фибриновый сгусток с клетками извлекали из дифференцировочной среды для трансплантации животным. Размер каждого композита составлял около 15×15 мм (рис. 1).



Рис. 1. МСК в фибриновом геле перед введением в дефект костной ткани собаки

Fig. 1. MSCs in fibrin gel before the introduction into the dog's bone defect

Нами проведена оценка высева клеток из фибринового сгустка в процессе культивирования клеток. Для этого все клетки, оставшиеся в среде после удаления из нее фибринового сгустка, подсчитывали под микроскопом и рассчитывали относительную потерю (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Потеря клеток после культивирования в составе композита

T a b l e 3. Loss of cells after cultivation in the composition of the composite

№ животного	Число МСК, $\times 10^6$		Потери, %
	изначально	вне композита	
1	12	0,18	1,50
2	12	0,1	0,83
3	19	0,07	0,37
4	30	0,33	1,10
5	34	0,38	1,12
Среднее значение	21,4 [12,4; 30,3]	0,2 [0,09; 0,33]	1 [0,6; 1,4]

Подсчет показал, что в среднем $0,2 [0,09; 0,33] \cdot 10^6$ клеток осталось на дне культуральных флаконов после изъятия имплантата, т. е. потеря составила $1 [0,6; 1,4] \%$ от первоначального числа клеток. Таким образом, в составе фибринового геля в область костного дефекта каждой собаки было доставлено 99 % клеток.

Остеогенная дифференцировка МСК в составе различных носителей. Для получения биомедицинского клеточного продукта проводили экспериментальный подбор скаффолда – каркаса для заселения его МСК. В качестве 3D-носителя для МСК было использовано три различных материала: фибриновый гель, биоактивированный гидроксипатит «Коллапан-К», коллагеновая гемостатическая губка Lyostypt. Суспензию МСК в среде IMDM соединяли с каждым из носителей в двух вариантах: недифференцированные МСК и МСК, дифференцированные в течение 10 сут в остециты в монослое. После дифференцировки в культуральной среде с индукторами остеогенеза клеточные импланты были подвергнуты гистологическому анализу.

Имплантация композита МСК животных (основная группа). Введение приготовленного композита МСК для заполнения костного дефекта собаки осуществлялось под наркозом, в асептических условиях операционной вивария в течение 1 ч после его получения. Первоначально формировали дефект костной ткани головки бедра собаки на контралатеральной стороне вышеописанным способом. Далее биомедицинский клеточный продукт МСК в стерильных условиях извлекали из питательной среды с помощью инструментов и вводили внутрикостно в головку бедра с помощью толкателя. Для предотвращения вытекания последнего после имплантации мышцы в вертельной зоне над костной раной плотно сшивали узловыми швами с надкостницей. Следует отметить, что при этом качество и консистенция клеточного продукта позволяли извлекать и имплантировать его как «единую гелеобразную массу» без визуальных потерь жидкой клеточной части.

Послеоперационное наблюдение. В послеоперационном периоде осуществляли наблюдение и уход за животными, антибиотикопрофилактику (бицилин-3 в/м однократно) и обезболивание (50 %-ный раствор анальгина и 1 %-ный раствор димедрола в/м) с учетом веса животного. В процессе наблюдения уделяли внимание общему состоянию животных, потреблению ими пищи и воды, состоянию кожной раны. После выхода из наркоза наблюдалось постепенное восстановление нормальной реакции на звуковые и световые раздражители, а также двигательной активности. В первые сутки последняя была снижена из-за действия наркотических анальгетиков и проведенного оперативного вмешательства. Полное восстановление функций, нормализация потребления воды и пищи отмечались на 2-е–3-и сутки после операции. Послеоперационный период у всех собак протекал благоприятно. Раны зажили первичным натяжением. В течение 3 недель после операции у лабораторных животных наблюдалась незначительная хромота. Перечень регистрируемых показателей в процессе наблюдения за животными представлен в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Перечень регистрируемых показателей

T a b l e 4. List of recorded indicators

Показатель	Сроки регистрации
Общее состояние животных	В течение всего эксперимента
Состояние кожной раны	В течение всего эксперимента
Наличие хромоты, ограничения движений в тазобедренных суставах	3, 7, 14, 21, 42, 90, 180-е сутки после операции
Морфологические исследования	Взятие материала (головки бедер) после вывода животного из эксперимента

Вывод животных из эксперимента и забор экспериментальных образцов. Животных выводили из эксперимента через 6 мес. после трансплантации МСК путем 3-кратной разовой передозировки наркоза или на фоне глубокого наркоза путем остановки сердца и дыхания с помощью дополнительных вмешательств (смертельные дозы миорелаксантов (дитилина)) с соблюдением принципов биоэтики (в соответствии с ТКП 125-2008). Далее производили забор биологического материала (головки бедренных костей) для дальнейших исследований.

Патоморфологическое исследование. Гистологическое исследование материала выполняли на базе РНПЦ ТО. Материалом являлись головки бедренных костей собак (10 головок бедер), полученные при выполнении экспериментального этапа работы. Операционный материал в лабораторию клинической морфологии РНПЦ ТО доставляли из вивария маркированным, с указанием локализации изъятого материала.

Фрагменты костной ткани головки бедренной кости после распила фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалиновом буфере. Костные препараты после фиксации декальцинировали в растворе муравьиной кислоты. Обезжиривание проводили в спиртах возрастающей концентрации, а кусочки ткани заливали в парафиновые блоки, из которых затем готовили гистологические срезы толщиной 4 мкм. Все микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ван-Гизона. Препараты изучали под световым микроскопом AxioVision 40 фирмы Carl Zeiss. Морфометрическое исследование костной ткани выполняли с помощью программного обеспечения обработки и анализа цифрового изображения AxioVision 4.7.2/Carl Zeiss (Modules Automatic measurement & Interactive measurement). С помощью гистоморфометрического метода измеряли общую площадь изучаемого гистопрепарата; площадь, занимаемую костными балками; процентное соотношение площади, занимаемой костными балками, к общей площади и площадь межбалочных пространств. На микрофотографиях гистологических препаратов ручным методом определяли толщину гиалинового хряща, толщину субхондральной костной пластинки и толщину костных балок на нагружаемых и ненагружаемых участках головки бедренной кости.

Статистический анализ был проведен с помощью программ MS EXCEL 2013, AtteStat. Использовались непараметрические методы, поскольку распределение количественных показателей в группах отличалось от нормального. При анализе количественных показателей высчитывали среднее значение и доверительный интервал с учетом небольшого объема выборки в виде $Me [\alpha, \beta]$.

Результаты и их обсуждение. Результаты гистологического анализа биомедицинского клеточного продукта после дифференцировки показали, что при заселении фибринового геля недифференцированными МСК с последующей направленной остеогенной дифференцировкой *in vitro* наблюдалось равномерное, плотное распределение в геле клеток с интенсивной функциональной синтетической активностью (рис. 2).

Заселение коллагеновой губки недифференцированными МСК с последующей остеодифференцировкой *in vitro* происходило неравномерно (островками), а при заселении остеогенно преддифференцированными в монослое МСК выявлены фибриновые волокна и отмечалось полное отсутствие клеток в носителе. При гистологическом анализе композитов с носителем «Коллапан-К» обнаружен только аморфный материал с кальцинатами. Жизнеспособные клетки или клеточный детрит на гистологических срезах не найдены.

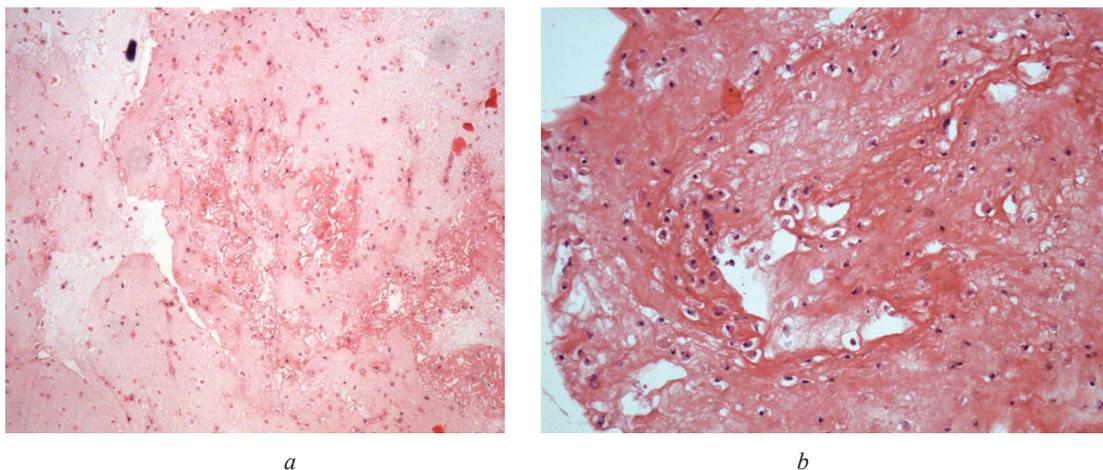


Рис. 2. Биокompозит недифференцированных МСК в фибриновом геле через 14 сут после остеодифференцировки в 3D-системе ($a - \times 40$, $b - \times 600$)

Fig. 2. Biocomposite of undifferentiated MSCs in the fibrin gel after 14 days osteodifferentiation in the 3D system ($a - \times 40$, $b - \times 600$)



Рис. 3. Экспериментальный образец № 1 после вывода животного из эксперимента: a – вид макропрепарата, b – рентгенограмма проксимальных отделов бедер собаки

Fig. 3. Experimental sample no. 1 after the animal withdrawal from the experiment: a – type of macropreparation, b – radiograph of the dog's proximal hips

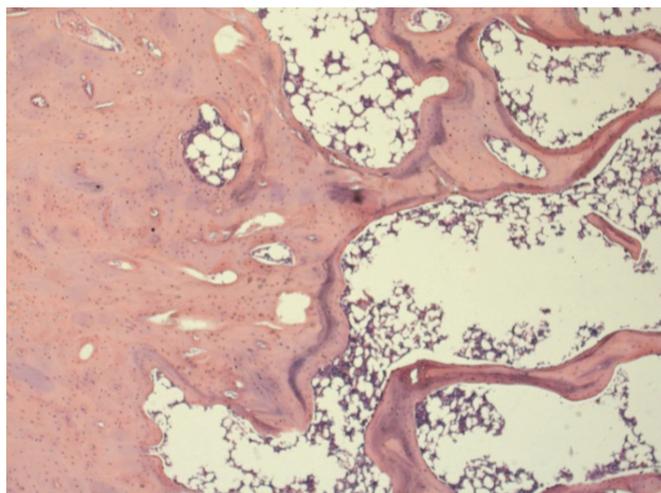


Рис. 4. Образование костной ткани после введения МСК (на месте введения МСК образуется зрелая костная ткань компактного строения с сочными остеобластами; отмечается напластование на предшествующие костные структуры вновь образованного остеοидного вещества; четко видны линии склеивания). Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото, $\times 50$

Fig. 4. Formation of the bone tissue after the MSC introduction (at the site of the MSC injection, the mature bone tissue of a compact structure with juicy osteoblasts is formed; the pre-existing bone structures are stratified by a newly formed osteoid substance; the bonding lines are clearly visible). Hematoxylin and eosin stain. Microphoto, $\times 50$

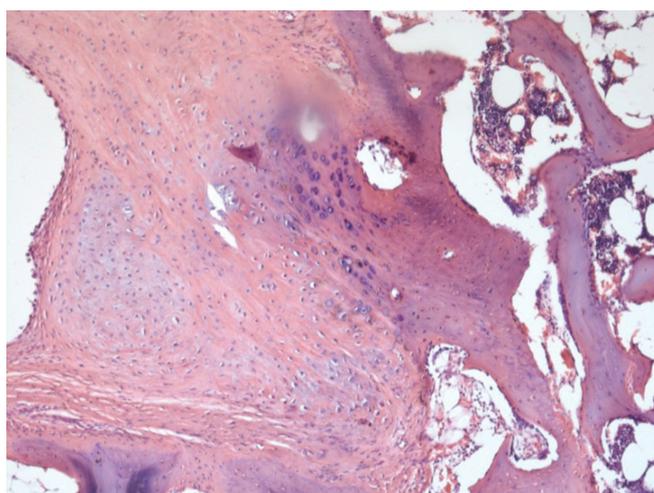


Рис. 5. Регенерация костной ткани без введения МСК (контрольная группа) (поля остео- и хондробластической ткани без формирования костных структур). Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото, $\times 100$

Fig. 5. Bone tissue regeneration without the MSC administration (control group) (osteo- and chondroblastic tissue fields without the formation of bone structures). Hematoxylin and eosin stain. Microphoto, $\times 100$

В ходе эксперимента проведены оперативные вмешательства (экспузия КМ для получения МСК и аутоотрансплантация клеточного продукта) на 5 собаках. После операций осуществляли наблюдение и уход за экспериментальными животными, а затем выводили их из эксперимента и производили забор биологического материала для дальнейших исследований (рис. 3).

Результаты гистологического исследования микропрепаратов головок бедренных костей собаки № 1 подтвердили образование зрелой костной ткани компактного строения с сочными остеобластами на месте введения МСК. В контралатеральной головке бедра собаки без введения МСК (контрольная сторона) место дефекта было выполнено грубоволокнистой остеобластической тканью без формирования костных структур (рис. 4).

Микропрепараты головок бедер собак № 2 и № 3 после введения МСК характеризовались утолщенными костными балками с напластованным остеοидным и костным веществом, четкими линиями склеивания. В межбалочном пространстве визуализировались кровеносные сосуды артериального типа, что подтверждает процессы остеοрегенерации. В головках бедер, в которые не вводили МСК, место дефекта было выполнено остеοбластической тканью с началом формирования остеοидных балочных структур. Зрелые костные структуры (костные балки) отсутствовали. Среди остеοбластической ткани были видны фрагменты некротизированных костных структур в стадии резорбции. Такая гистологическая картина позволила сделать заключение о том, что применение остеοдифференцированных МСК в составе фибринового геля стимулирует и улучшает остеοрегенерацию дефектов головки бедренной кости. Микропрепараты головок бедер собак № 4 и № 5 показали схожую гистологическую картину в основной и контрольной группах. Существенных отличий регенерации костной ткани не обнаружено. На наш взгляд, причина этого – большие сроки наблюдения за животными (6 мес.) после формирования дефектов и введения МСК в головку бедра. В нашей работе это было вынужденным обстоятельством. Оптимальным сроком для оценки результатов остеοрегенерации костной ткани у собак можно считать 3 мес. Гистологических изменений в тканях тазобедренных суставов животных (суставном хряще, мышцах, связках, капсуле и синовиальной оболочке) не наблюдалось.

Реконструкция участка костной ткани требует особого подхода, т. е. создания клеточной конструкции на основе носителя, при этом важнейшим является сохранение жизнеспособности и функциональной активности клеток. Идеальный носитель должен обладать такими свойствами, как биосовместимость, остеοиндуктивность, биопроводимость, а также физическими свойствами, которые будут позволять перенести клеточный продукт из пробирки в головку бедра с помощью хирургического инструмента. Поскольку очаг некроза головки расположен на большой глубине, носитель должен сохранять свои физические свойства на протяжении всего процесса пространственного перемещения и имплантации. В противном случае возможны растекание, разрыв биокомпозита и потеря клеток. Ряд исследователей для хирургической имплантации клеток в головку бедра использовали пункционный способ [15], однако, на наш взгляд, технически выполнить пункцию костной ткани головки бедра весьма затруднительно, тем более ввести туда жидкий клеточный продукт, который бы впоследствии оказал влияние на окружающую кость. В качестве другого способа описана внутриартериальная доставка аутологичных МСК через медиальную огибающую бедренную артерию к головке бедра [19]. Но, учитывая высокую скорость кровотока в артерии подобного калибра, можно предположить весьма кратковременное воздействие МСК на пораженную зону головки бедра.

Проведенные нами экспериментальные исследования на животных позволили отработать на практике протокол получения МСК и создать оптимальный каркас-носитель для введения МСК в зону некроза. Нами создан оптимальный, на наш взгляд, способ трансплантации МСК с использованием стволовых клеток, полученных из КМ. Для уменьшения травматичности вмешательства, минимизации потери клеточного продукта в качестве скаффолда был выбран фибриновый гель. Для предотвращения вытекания геля из дефекта кости после имплантации мышцы в вертельной зоне над костной раной плотно сшивали с надкостницей. При оценке результатов эксперимента учитывали схожесть массо-ростовых показателей собак, размеры и локализацию созданных дефектов, способы трансплантации биокомпозитов, схожие сроки наблюдения за животными. Результаты трансплантации оценивали в сравнении с таковыми в контрольной группе.

Фибриновый носитель может применяться как тканевой заместитель в связи с хорошей биосовместимостью, биодegradацией и способностью поддерживать пролиферацию и дифференцировку внесенных в него клеток. Основу фибринового геля составляет фибрин – натуральный фиброзный протеин, участвующий в процессе свертывания крови. Кроме того, преимуществом является способность фибринового геля формировать непрерывную границу с костной тканью в месте имплантации.

Заклученне. Результаты по заселению носителей МСК различной степени остеогенной дифференцировки показали, что преимущество имеет метод заселения носителей недифференцированными МСК с последующей дифференцировкой клеток уже в составе композита.

При сравнительном исследовании свойств различных носителей для клеточного продукта МСК с целью репарации костной ткани установлено, что в качестве скаффолда наиболее перспективно использовать фибриновый гель, который заселяется клетками равномерно, причем гистологический анализ свидетельствует об активной выработке клетками белка.

Результаты гистологического исследования микропрепаратов головок бедренных костей собак подтверждают образование зрелой костной ткани компактного строения с остеобластами на месте введения МСК. В экспериментальных образцах контрольной группы (без введения МСК) место дефекта выполнено грубоволокнистой остеобластической тканью без формирования костных структур.

Экспериментально разработанный нами способ аутотрансплантации МСК показал свою эффективность в восстановлении костной ткани головки бедра и может быть рекомендован для применения в клинической практике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Эффективность использования биорезорбируемых материалов для заполнения костных полостей при остеонекрозе головки бедренной кости / В. А. Конев [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2014. – № 3. – С. 28–38.
2. Hernigou, P. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis / P. Hernigou, F. Beaujean, J. C. Lambotte // J. Bone Joint Surg. – 1999. – Vol. 81, N 2. – P. 349–355. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.81b2.8818>
3. Klingemanna, H. Mesenchymal stem cells – sources and clinical applications / H. Klingemann, D. Matzilevich, J. Marchand // Transfus. Med. Hemother. – 2008. – Vol. 35, N 4. – P. 272–277. <https://doi.org/10.1159/000142333>
4. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells / K. Stenderup [et al.] // Bone. – 2003. – Vol. 33, N 6. – P. 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>
5. Conget, P. A. Identification of a discrete population of human bone marrow-derived mesenchymal cells exhibiting properties of uncommitted progenitors / P. A. Conget, C. Allers, J. J. Minguell // J. Hematother. Stem Cell Res. – 2001. – Vol. 10, N 6. – P. 749–758. <https://doi.org/10.1089/152581601317210845>
6. Malluche, H. Renal bone disease 1990: an unmet challenge for the nephrologist / H. Malluche, M. C. Faugere // Kidney Int. – 1990. – Vol. 38, N 2. – P. 193–211. <https://doi.org/10.1038/ki.1990.187>
7. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease / Nat. Kidney Found. // Am. J. Kidney Dis. – 2003. – Vol. 42, N 4, suppl. 3. – P. S1–S201.
8. The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS): design, data elements, and methodology / R. L. Pisoni [et al.] // Am. J. Kidney Dis. – 2004. – Vol. 44, N 5C, suppl. 2. – P. 7–15. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.08.005>
9. Development of an osteogenic bone-marrow preparation / J. Connolly [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 1989. – Vol. 71, N 5. – P. 684–691. <https://doi.org/10.2106/00004623-198971050-00007>
10. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells associated with tantalum rod implantation and vascularized iliac grafting for the treatment of end-stage osteonecrosis of the femoral head / D. Zhao [et al.] // BioMed Res. Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/240506>
11. An exploratory clinical trial for idiopathic osteonecrosis of femoral head by cultured autologous multipotent mesenchymal stromal cells augmented with vascularized bone grafts / T. Aoyama [et al.] // Tissue Eng. Part B: Rev. – 2014. – Vol. 20, N 4. – P. 233–242. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0090>
12. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula / K. Kawate [et al.] // Artif. Organs. – 2006. – Vol. 30, N 12. – P. 960–962. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2006.00333.x>
13. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells / G. D'Ippolito [et al.] // Bone. – 2006. – Vol. 39, N 3. – P. 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.061>
14. Langenbach, F. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro* / F. Langenbach, J. Handschel // Stem Cell Res. Ther. – 2013. – Vol. 4, N 5. – Art. 117. <https://doi.org/10.1186/scrt328>
15. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection / A. Lebouvier [et al.] // Stem Cell Res. Ther. – 2015. – Vol. 6, N 1. – Art. 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0036-y>
16. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head / Z. Yan [et al.] // J. Orthop. Res. – 2009. – Vol. 27, N 4. – P. 442–446. <https://doi.org/10.1002/jor.20759>

17. Core decompression with marrow stem cells / P. Hernigou [et al.] // *Oper. Tech. Orthop.* – 2004. – Vol. 14, N 2. – P. 68–74. <https://doi.org/10.1053/j.oto.2004.03.001>
18. Stem cell treatment for avascular necrosis of the femoral head: current perspectives / R. J. Sierra [et al.] // *Stem Cells Cloning: Advances Applications.* – 2014. – Vol. 7. – P. 65–70. <https://doi.org/10.2147/scca.s36584>
19. The efficacy of targeted intraarterial delivery of concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells in the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a five year follow-up study / Q. Mao [et al.] // *Bone.* – 2013. – Vol. 57, N 2. – P. 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.08.022>

References

1. Konev V. A., Tikhilov R. M., Shubnyakov I. I., Myasoedov A. A., Denisov A. O. Bioresorbable materials for bone defects substitution in patients with osteonecrosis of the femoral head. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and orthopedics of Russia], 2014, no. 3, pp. 28–38 (in Russian).
2. Hernigou P., Beaujean F., Lambotte J. C. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1999, vol. 81, no. 2, pp. 349–355. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.81b2.8818>
3. Klingemann H., Matzilevich D., Marchand J. Mesenchymal stem cells – sources and clinical applications. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2008, vol. 35, no. 4, pp. 272–277. <https://doi.org/10.1159/000142333>
4. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 2003, vol. 33, no. 6, pp. 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>
5. Conget P. A., Allers C., Minguell J. J. Identification of a discrete population of human bone marrow-derived mesenchymal cells exhibiting properties of uncommitted progenitors. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, 2001, vol. 10, no. 6, pp. 749–758. <https://doi.org/10.1089/152581601317210845>
6. Malluche H., Faugere M. C. Renal bone disease 1990: an unmet challenge for the nephrologist. *Kidney International*, 1990, vol. 38, no. 2, pp. 193–211. <https://doi.org/10.1038/ki.1990.187>
7. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 2003, vol. 42, no. 4, suppl. 3, pp. S1–S201.
8. Pisoni R. L., Gillespie B. W., Dickinson D. M., Chen K., Kutner M. H., Wolfe R. A. The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS): design, data elements, and methodology. *American Journal of Kidney Diseases*, 2004, vol. 44, no. 5C, suppl. 2, pp. 7–15. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.08.005>
9. Connolly J., Guse R., Lippiello L., Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 1989, vol. 71, no. 5, pp. 684–691. <https://doi.org/10.2106/00004623-198971050-00007>
10. Zhao D., Liu B., Wang B., Yang L., Xie H., Huang S., Zhang Y., Wei X. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells associated with tantalum rod implantation and vascularized iliac grafting for the treatment of end-stage osteonecrosis of the femoral head. *BioMed Research International*, 2015, vol. 2015, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/240506>
11. Aoyama T., Goto K., Kakinoki R., Ikeguchi R., Ueda M., Kasai Y. [et al.]. An exploratory clinical trial for idiopathic osteonecrosis of femoral head by cultured autologous multipotent mesenchymal stromal cells augmented with vascularized bone grafts. *Tissue Engineering. Part B: Reviews*, 2014, vol. 20, no. 4, pp. 233–242. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0090>
12. Kawate K., Yajima H., Ohgushi H., Kotobuki N., Sugimoto K., Ohmura T. [et al.]. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artificial Organs*, 2006, vol. 30, no. 12, pp. 960–962. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2006.00333.x>
13. D'Ippolito G., Diabira S., Howard G. A., Roos B. A., Schiller P. C. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*, 2006, vol. 39, no. 3, pp. 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.061>
14. Langenbach F., Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro*. *Stem Cell Research and Therapy*, 2013, vol. 4, no. 5, art. 117. <https://doi.org/10.1186/srct328>
15. Lebouvier A., Pognard A., Cavet M., Amiaud J., Leotot J., Hernigou P. [et al.]. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Research and Therapy*, 2015, vol. 6, no. 1, art. 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0036-y>
16. Yan Z., Hang D., Guo C., Chen Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. *Journal of Orthopaedic Research*, 2009, vol. 27, no. 4, pp. 442–446. <https://doi.org/10.1002/jor.20759>
17. Hernigou P., Manicom O., Pognard A., Nogier A., Filippini P., de Abreu L. Core decompression with marrow stem cells. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 2004, vol. 14, no. 2, pp. 68–74. <https://doi.org/10.1053/j.oto.2004.03.001>
18. Sierra R. J., Houdek M. T., Wyles C. C., Martin J. R. Stem cell treatment for avascular necrosis of the femoral head: current perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 2014, vol. 7, pp. 65–70. <https://doi.org/10.2147/scca.s36584>
19. Mao Q., Jin H., Liao F., Xiao L., Chen D., Tong P. The efficacy of targeted intraarterial delivery of concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells in the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a five year follow-up study. *Bone*, 2013, vol. 57, no. 2, pp. 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.08.022>

Информация об авторах

Мурзич Александр Эдуардович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии (ул. Кижеватова, 60/4, 220024, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mae77@list.ru

Пашкевич Людмила Антоновна – д-р мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии (ул. Кижеватова, 60/4, 220024, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pashkevichla@mail.ru

Жерносеченко Анна Александровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: sapphire.anna@gmail.com

Information about the authors

Alyaksandr E. Murzich – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics (60, Bld. 4, Kizhevatov Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mae77@list.ru

Lyudmila A. Pashkevich – D. Sc. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics (60, Bld. 4, Kizhevatov Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pashkevichla@mail.ru

Hanna A. Zhernasechanka – Researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: sapphire.anna@gmail.com