

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА В СОЗДАНИИ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ОСТЕОЗАМЕЩАЮЩЕГО ТРАНСПЛАНТАТА IN VITRO

Деркачев В.С.¹, Алексеев С.А.¹, Космачева С.М.², Потапнев М.П.²

¹Белорусский государственный медицинский университет,

²РНПЦ «Трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

Основная задача тканевой инженерии в области лечения костных патологий – создание искусственных композитов, состоящих из алло- и/или ксеноматериалов в сочетании со стволовыми клетками и биоактивными молекулами (костные морфогенетические белки, факторы роста и т.д.), способных индуцировать остеогенез. В последнее время для пластики костных дефектов все шире применяются различные синтетические костные имплантаты в виде материалов из керамики, коллагеновых и неколлагеновых белков, биоактивных стекол и биodeградируемых полимеров [1]. Анализ литературы позволяет сделать вывод о том, что, несмотря на широту спектра материалов для костной пластики, на сегодняшний день ни один из них не отвечает всем требованиям современной реконструктивной хирургии. Синтетические материалы, используемые для заполнения костных дефектов в процессе оперативных вмешательств, имеют ряд недостатков. Полимерные синтетические и металлические материалы, разрешенные к применению, обладают недостаточной биосовместимостью, а покрытия, увеличивающие их совместимость, обычно не долговечны. Эти обстоятельства обуславливают необходимость разработки биосовместимых материалов для заполнения костных дефектов и стимуляции остеогенеза в дефекте. В идеале такие материалы должны быть биосовместимыми, т.е. не отторгаться и не угнетать морфогенетических потенциалов окружающих тканей, поддерживать дифференцировку собственных стромальных стволовых клеток надкостницы, или ауто- и аллогенных культур клеток, иметь открытую пористость и взаимосвязанность пор для обеспечения биологических потоков и заселения клетками. Скорость резорбции таких материалов должна быть сопоставима со скоростью формирования в месте дефекта новой костной ткани [1, 2, 3].

В настоящее время в клинической практике с целью стимуляции процесса остеогенеза находит метод использования обогащенной тромбоцитами аутоплазмы. В тромбоцитах

содержатся многочисленные факторы роста и цитокины, способствующие свертыванию крови, регенерации ткани и процессам минерализации кости [4].

Цель данного этапа работы: Разработать технологию создания многокомпонентного биотрансплантата и оценить возможность использования МСК костного мозга для замещения дефектов костей у экспериментальных животных.

Материалы и методы:

1.1. *Наращивание и предифференцировка МСК для трансплантата.*

МСК костного мозга наращивали в течение 3-х пассажей в культуральной среде α -MEM (Sigma) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотке (Sigma), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. В течение культивирования оценивали морфологию и контролировали стерильность. При достижении клетками 3-го пассажа 80-90% конfluenceности меняли питательную среду на остеогенную индукционную среду (полная питательная среда с дифференцировочными факторами: дексаметазон (0,1 мМ), аскорбиновая кислота (50 мкМ) и β -глицерофосфат (10 мМ)). Предифференцировку проводили в течение 5-7 дней с заменой среды через 3 дня.

1.2. *Получение клеточного трансплантата для экспериментов *in vivo*.*

После завершения культивирования предифференцированные клетки снимали с адгезионной поверхности флаконов T75 0,25% раствором трипсина с ЭДТА, отмывали 0,9% раствором натрия хлорида изотоническим для инфузий (NaCl, пр-во РУП «Несвижский завод медицинских препаратов») с 1 % сыворотки АВ (IV) человека центрифугированием 10 мин. при 1500 об/мин. Индуцированные к остеогенной дифференцировке МСК ресуспензировали в 1,5 мл 0,9% раствора NaCl с добавлением 5% сыворотки АВ (IV).

Проводили подсчет количества, определение жизнеспособности клеток и иммунофенотипический контроль культуры клеток. Суспензию клеток из пробирки Falcon 15 мл переносили в криопробирку на 5 мл и помещали в термоконтейнер для дальнейшей транспортировки.

1.3. *Приготовление комбинаций биотрансплантатов на основе МСК для замещения дефектов костей у экспериментальных животных.*

Данные литературы свидетельствуют, что стволовые клетки, введенные в костные дефекты, стимулируют репаративный остеогенез и способствуют более быстрому заживлению костных ран. Особый интерес представляет совместное использование для лечебных целей стволовых клеток и трансплантационных материалов [5].

В качестве примера представляем один из вариантов многокомпонентного трансплантата.

Трансплантат №1. МСК 1-го пассажа $1,8 \times 10^6$ высевали на 5 флаконов Т-75 по $0,36 \times 10^6$ клеток на флакон в посевной концентрации $4,8 \times 10^3/\text{см}^2$. Культивировали клетки при 37°C и 5% CO_2 . При наращивании клетки имели фибробластоподобную морфологию; имели длинные, нередко разветвляющиеся отростки и обычно располагались небольшими группами, контактируя между собой. Через 7 дней, когда конfluence монослоя достигла 85-90%, МСК 2-го пассажа перевели на остеоиндукционную среду. Предифференцировка проводилась 7 дней. По истечении 7-ми дней клетки по-прежнему имели фибробластоподобную морфологию. Количество пре-остеоиндуцированных МСК после снятия с культивируемой поверхности составило $9,2 \times 10^6$. Клетки ресуспендировали в 1,5 мл. 0,9% физ. раствора с 5% сывороткой АВ. Продолжительность наращивания клеточного трансплантата составила 7 дней, наращивание с учетом остеоиндукции – 14 дней.

Выводы:

- получены положительные результаты по взаимодействию *in vitro* основных компонентов биотрансплантата;
- определены основные составляющие многокомпонентного остеогенного биотрансплантата;
- подготовлены трансплантаты для экспериментальной модели *in vivo* на животных.

Список литературы

1. Чиссов В.И., Сергеева Н.С., Решетов И.В. и др. Клеточные технологии в замещении тканевых дефектов в онкологии// Вестник РАМН 2006; 6: 34-8.
2. Чиссов В.И., Свиридова И.К., Сергеева Н.С. и др. Изучение *in vivo* биосовместимости и динамики замещения дефекта голени у крыс пористыми гранулированными биокерамическими материалами // Клеточные технологии в биологии и медицине 2008; 3: 151-6.
3. Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Решетов И.В. и др. Разработка биоинженерных конструкций на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток [МСЮ и 3D материалов - матриц синтетических и природного происхождения с целью восстановления костных дефектов у экспериментальных животных.// Материалы III Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». 2007; 25-26 апреля, Москва, Россия, 41-42.
4. Bertoldi C., Pinti M., Zaffe D. et al. Morphological, histochemical, and functional analysis of platelet-rich plasma activity on skeletal cultures cells //Transfusion.- 2009.-Vol. 49 (8). - P. 1728 – 1737.

5. Вольперт У.В., Янушевич О.О., Григорьян А.С. и др. Заживление костных дефектов ветви нижней челюсти кроликов под биоинженерными конструкциями из титана и золотого сплава с ксеногенными мезенхимальными стволовыми клетками // Стоматология, № 2009, с. 4-8.