ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНО-ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ МЕТОДОМ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Ермоленко Е.М. Чуксин В.П*

УО «Белорусский государственный медицинский университет» кафедра биоорганической химии, НИЧ лаборатория биохимических методов исследования

*УЗ «6 городская клиническая больница, Городской клинический центр травматологии и ортопедии», НИЧ лаборатория биохимических методов исследования**

Актуальность - Среди актуальных медицинских проблем, требующих глубокого изучения, одно из важных мест занимает проблема патологии суставов. Сейчас во всем мире наблюдается тенденция к увеличению процента доли этих заболеваний.

В настоящее время выделяют более 80 нозологических форм заболеваний суставов. По данным ВОЗ ими страдает около 4% населения земного шара, с заболеваниями крупных суставов связано 30% случаев временной нетрудоспособности и 10% инвалидности (2). Несколько меньшее, но все равно, значительное количество составляют дегенеративные изменения хряща как последствие спортивной или производственной травмы. Вследствие крайне низких репаративных способностей суставного хряща, подобные дефекты обычно сохраняются в течение всей жизни человека и вызывают прогрессирование дегенеративных изменений в суставе. На сегодняшний момент существует острая необходимость в улучшении качества лечения заболеваний суставного хряща и подлежащей субхондральной кости. С точки зрения тканевой инженерии, суставной хрящ представляет собой достаточно сложную ткань для лечения, так как из-за предшествующего воспаления не происходит экспрессии ни типичных для воспалительного процесса маркеров, которые наблюдаются в других тканях, ни спонтанной регенерации (2).

Наиболее многообещающие перспективы восстановления хрящевой ткани связывают с тканевой инженерией, которая предлагает альтернативу традиционным стратегиям лечения поврежденного хряща в результате травмы или дегенеративного заболевания. В последнее время с этой целью начало применяться замещение дефектов хряща культурой собственных зрелых хондроцитов либо хондрогенных производных стволовых клеток. Восстановление хряща на ранних стадиях его дегенерации сможет в дальнейшем не только компенсировать, но и предотвратить развитие деформирующего остеоартроза и необходимость тотального

эндопротезирования сустава в поздних стадиях заболевания, что принесет несомненный экономический эффект и значительно улучшит качество жизни пациентов (3,5) .

В настоящее время ведется активный поиск клинически приемлемых технологий клеточной репарации хряща, однако до сих пор существует ряд проблем, препятствующих широкому применению данных методов в клинической практике. В частности, основные трудности связаны с получением достаточного количества адекватного активно пролиферирующего клеточного материала, который имел бы минимальный потенциал к дедифференцировке или быстро мог быть дифференцирован в нужном направлении.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), являются наиболее перспективным источником трансплантационного материала для восстановления соединительной ткани. МСК обладают способностью дифференцироваться в адипоциты, миоциты, хондроциты, остеоциты и даже клетки иного происхождения, например эндокринные. Из 150-200 грамм жировой ткани можно выделить порядка 1 миллиона стволовых клеток, что является адекватным количеством для дифференцировки и применения в клинических целях.

Достаточно важной проблемой является подбор и апробация внеклеточного матрикса, который выступал бы в качестве эффективного носителя для клеток и мог быть имплантирован в область хондрального дефекта с минимальной инвазивностью и сохранением при этом биомеханических свойств. Создание адекватного матриксного носителя – одно из основных условий, необходимых для успешной хондрогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

В последние годы резко возрос интерес к альгинатам. Альгинаты представляют собой гидрофильные морские биополимеры, обладающие уникальной способностью образовывать термостабильные гели, которые могут формироваться и становиться более плотным при физиологически значимых условиях. Альгинаты представляют собой семейство неразветвленных двойных сополимеров остатков β-D-маннуроновой кислоты и α-L-глюкуроновой кислоты, соединенных 1-4 гликозидной связью. Относительное количество двух мономеров уроновой кислоты и последовательность их расположения в полимерной цепи широко варьирует в зависимости от природы альгината. Альгинатные гели образуются, когда двухвалентный катион формирует ионные связи с отрицательно заряженной группой из G остатка каждого из двух различных альгинатных полимеров, в результате чего два полимера оказываются поперечно сшитыми. Образование множества поперечных связей между многочисленными альгинатными полимерами приводит к образованию

матрикса, который представляет собой структуру альгинатного геля. Благодаря этому, а также способности образовывать гели в физиологических условиях, альгинаты широко используются и изучаются для целей инкапсуляции, в качестве биоструктурного материала и для включения клеток в альгинатные гранулы (1,4,6).

Проделанная нами работа и была посвящена условиям получения, культивирования и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток, подбору оптимальных условий для заключения МСК в матрикс-носитель с последующей трансплантацией в область повреждения суставного хряща в экспериментальной модели.

Цель исследования – изучить возможность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в составе альгинатного матриксного носителя для лечения дефектов суставного хряща.

Материалы и методы.

Выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани. Липоаспират тщательно отмывали раствором фосфатного буфера, после чего подвергали ферментации 0,075% раствором коллагеназы I типа в течение 30-60 мин. Для нейтрализации фермента добавляли к смеси равный объем фосфатного буфера с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Отмывали полученную клеточную суспензию. Клетки культивировали при при 37°C и 5% CO2 в полной питательной среде α-MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone) до достижения количества 5 млн.кл. Все манипуляции проводили в стерильных условиях.

*Подготовка трансплантата на основе альгината и недифференцированных МСК ЖТ. (*2% альгинат, приготовленный на 0,9% NaCl+50 мМ $CaCl_2$ для полимеризации). Для приготовление альгинатного раствора соль (в/о) (low viscosity, Sigma) растворяли в физиологическом растворе. Клетки были сняты с поверхности культуральных флаконов раствором 0,25% трипсина/0,02% ЭДТА (Invitrogen), после чего клетки вносили в лунку с раствором альгината в количестве 5 млн/лунку и аккуратно пипетировали для равномерного распределения в объеме раствора.

Трансплантация МСК экспериментальным животным с повреждением хряща.

В качестве экспериментальных животных были выбраны кролики. Для исследования брали кроликов самцов в возрасте 6 месяцев весом 5-6 кг. Было проведено 6 операций (2 - контроль, 4 - опыт)

Для контроля проводили операцию по нанесению дефекта в области головки бедренной кости без последующей трансплантации МСК. Опытным животным проводили трансплантацию ксеногенных (человеческих) МСК в

область дефекта (n=2). Было проведено четыре операции: опыт №1 – трансплантация недифференцированных МСК ЖТ в виде суспензии (n=2), опыт № 2 - трансплантация недифференцированных МСК ЖТ в альгиматриксе (n=2). Все операции проводили по единому протоколу. Из разреза по заднебоковой поверхности левого бедра, в проекции большого вертела бедренной кости, послойно рассекали мягкие ткани. Выделяли тазобедренный сустав с капсулой и вскрывали капсулу сустава. Производили подвывих головки бедра. На открывшейся суставной поверхности головки бедра, распатором, наносили дефект хряща, площадью 0.5 $см^2$. В дефект дозатором вносили суспензию 0.5 мл содержащую МСК в количестве 5 млн. клеток (опыт №1) или МСК в альгинатном матриксном носителе. Для фиксации трансплантата в области дефекта использовали фибриновый клей. Головка бедра вправлена в суставную впадину. Шов капсулы сустава, Дренирование, послойный шов раны.

Анестезия. Операцию проводили под внутривенным наркозом раствором тиопентала натрия. Индукция: 3-5мг\кг, 20мг. Глубина наркоза III_1 (хирургическая стадия), поддержание анестезии – внутривенно тиопентал натрия 20мг.

Результаты и их обсуждение.

Клинические результаты экспериментальных операций по трансплантации МСК. Динамическое клиническое наблюдение животных проводили в течение 12 недель. В течение 3-х дней после операции проводили обезболивание – в\м кеторолак в дозе 0.5 мл 1 раз в день. В течение 14 дней после проведения операции кролики получали профилактические дозы антибиотика – бицилин 3 в\м в дозе 1.5 мл раз в три дня. Для описания клинического состояния послеоперационных животных оценивали общее состояние (общий анализ крови, температура тела), положение, движения в суставе, опороспособность конечности, силу конечности, заживление раны и рентгенологические снимки в динамике.

Общее состояние контрольных и экспериментальных животных на протяжении экспериментального периода было удовлетворительное. Общий анализ крови и температура тела у всех экспериментальных животных были в пределах нормы в течение 12 дней после операции. а температура тела держалась на верхней границе нормы в течение всего периода наблюдения – $39\text{-}40^0$ С (норма для кроликов 37,5 – 40).

Положение: контроль - вынужденное, стойкая смешанная контрактура тазобедренного и коленного суставов с 3-4 недели, анкилоз - с 6-8 недели; опыт №1(МСК) – пассивное до 12 недели; опыт №2 (МСК биоматрикс) - активное с 4- 5 недели.

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

Движения в суставе: контроль – движения нет, стойкая контрактура, анкилоз. (Контрактура с 3-4 недели, анкилоз – с 6-8 недель).
опыт №1 (МСК) - движения умеренно болезненные, объем полный до 12 недели наблюдения; опыт №2 (МСК биоматрикс) – к концу наблюдения движения безболезненные, в полном объёме.

Опороспособность: контроль – нет, опыт №1 (МСК) – сохранена, при движении щадили конечность в течение всего периода наблюдения, опыт №2 (МСК биоматрикс) – сохранена полностью к 7-8 неделе наблюдения.

Сила: опыт №1(МСК) – умеренное снижение силы оперированной конечности в сравнении со здоровой в течение наблюдения, опыт №2 (МСК биоматрикс) - сохранена, примерно равна силе здоровой конечности с 7-8 недели наблюдения.

Рентгенологические исследования проводили на первой и последней неделе исследования.

Контроль – на 1-й неделе исследования выявлен дефект хрящевой ткани, на 12-ой неделе наблюдения выявлены косвенные признаки остеомиелита бедренной кости.

Контроль положительный (без дефекта) - суставная щель не изменена, суставные поверхности головки бедренной кости и дна вертлужной впадины конгруэнтны.

Опыт №1 (МСК) - Определяется незначительное сужение суставной щели. Суставные поверхности головки бедренной кости и дна вертлужной впадины конгруэнтны. Явления умеренного субхондрального остеосклероза крыши вертлужной впадины. Начальные признаки коксартроза.

Опыт №2 (МСК альгиматрикс) – Сужения суставной щели не определяется. Суставные поверхности головки бедренной кости и дна вертлужной впадины конгруэнтны. Явления начального субхондрального остеосклероза крыши вертлужной впадины.

Выводы: В ходе проведенных экспериментов было показано, что лучшие клинические результаты восстановления повреждения хрящевой ткани получены при трансплантации МСК ЖТ, заключенных в альгинатный матрикс. Клинические результаты трансплантации недифференцированных МСК в альгинатном матриксе указывают на целесообразность дальнейшего изучения и перспективы применения данного способа лечения при дефектах хрящевой ткани.

Список литературы.

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com
ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

1. Мельвик Я.Э.,Дорниш М.,Онсоюен Э.,Берге А.Б.,Свендсен Т. Саможелирующиеся альгинатные системы и их применение. Заявка: 2007117702/15, 12.10.2005
2. Стародубцева И.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на показатели гликозаминогликанов у больных остеоартрозом. диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 2008г
3. Aigner T., Vornehm S.I., Zeiler G., et al. Suppression of cartilage matrix gene expression in upper zone chondrocytes of osteoarthritic cartilage. Arthritis Rheum 1997; 40: 562—569
4. Augst A.D., Kong H.J., Mooney D.J. Alginate hydrogels as biomaterials. Macromol Biosci. 2006; 6: 623–633.
5. Brandt K.D. Insights into the natural history of osteoarthritis provided by the cruciatedeficient dog. An animal model of osteoarthritis. Ann N Y Acad Sci 1994; 732:199—205
6. PW Dettmar, V. Strugala and JC Richardson, The key role alginates play in health, Food Hydrocoll. **25** (2011) 263-266.