

УДК 616.71-018.44-002-07:616.15:611.018

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
СЫВОРОТКИ КРОВИ, КАК НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ
СУСТАВОВ ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ**

Николаев В. И., Надыров Э. А., Белецкий А. В.

**Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь
Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии»
г. Минск, Республика Беларусь**

Введение

Развитие медицины конца XX – начала XXI вв., прежде всего, связано с бурным внедрением клеточных технологий для лечения различных заболеваний. Травматология и ортопедия в этом смысле находятся на передовых позициях, уступая лишь онкогематологии [1]. В структуре клинических форм болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани ведущее место принадлежит остеоартрозу (ОА), которым страдает 10–20 % людей на Земле. ОА является полиэтиологическим заболеванием, но при этом патоморфологические изменения сходны и в конечном итоге ведут к разрушению клеточных структур хряща – хондроцитов. Отсутствие собственной надхрящницы практически сводит к нулю возможность репаративной клеточной регенерации суставного хряща [2]. Это определило основное направление реконструктивной хирургии ОА — тотальное эндопротезирование суставов. Наряду с увеличением количества первичных имплантаций, в последние годы идет увеличение (до 20 % и более) ревизионных операций по замене ранее установленных эндопротезов, особенно у пациентов молодого и среднего возраста [3]. Несмотря на увеличение «линейки» предлагаемых конструкций эндопротезов, на современном этапе это не столь заметно переходит в качество лечения. В связи с чем «биологическое» направление как дополнительная медицинская технология локальной терапии ОА, базирующееся на использовании клеточных технологий и биоимплантологии, вероятно, займет ведущее место в современной артрологии.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга в зависимости от условий микроокружения *in vitro* или *in vivo* способны дифференцироваться по нескольким направлениям — фибробластическому, остеобластическому, хондроцитарному, адипоцитарному. В клинической и экспериментальной артрологии накоплен значительный опыт выделения, экспансии *in vitro* и индукции направленной хондроцитарной дифференцировки, для которой используют ряд веществ, в первую очередь, цитокины из семейства трансформирующих факторов роста β [4]. Логично инъекционное введение в полость сустава взвеси ММСК или культивированных хондроцитов в расчете на их самостоятельную миграцию и адгезию в области поврежденного гиалинового хряща. Однако, одним из не решенных вопросов в клеточной артропластике при локальных повреждениях суставного хряща и ОА является выбор оптимального носителя клеток. С биологической точки зрения в этом плане наиболее подходит сыворотка крови (СК) как абсолютно биосовместимая среда, обладающая не только сходным составом с натуральной синовиальной жидкостью, но и гистомоделирующим эффектом на суставной хрящ при ОА [5].

Цель

Изучить влияние взвеси мезенхимальных стволовых клеток и ее комбинации с сывороткой крови на репаративный хондрогенез при ОА в эксперименте.

Методы

Для получения культуры ММСК использовались мыши линии С57В1/6 6–8-недельного возраста, массой $20 \pm 5,25$ г. Всего в эксперименте было задействовано 40 животных (самок). Заготовку сыворотки осуществляли из крови лабораторных животных (линейных мышей) после декапитации последних.

Для трансплантации ММСК были сформированы три группы лабораторных животных, состоящие из восьми самок линейных мышей (линия С57В1/6) в каждой: I группа (контрольная), на которой была отработана модель ОА и подобраны оптимальные сроки для продолжения эксперимента; II группа — терапия ОА только мезенхимальными стволовыми клетками в среде DMEM; III группа — терапия ОА путем введения стволовых клеток в смеси с сывороткой.

Все животные находились в одинаковых условиях, без изменения в количестве и составе пищи.

Моделирование остеоартроза осуществлялось механическим повреждением суставного хряща внутреннего мыщелка левого бедра инъекционной иглой с сечением 30G — 0,30 мм. Введение иглы осуществлялось через связку надколенника после ее визуализации путем рассечения кожи на 0,5–0,7 мм.

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток в полость сустава осуществлялась инъекционным способом под визуализированную связку надколенника через 7 суток после процедуры моделирования ОА, к этому сроку морфологическим и иммуногистохимическим методом было подтверждено развитие ОА.

Животных после формирования морфологических и гистохимических признаков ОА выводили из эксперимента в сроки через 7 дней после каждой из трех трансплантаций ММСК и их смеси с сывороткой путем передозировки наркоза.

Для верификации изменений, возникающих в суставах животных проводилось морфологическое и иммуногистохимическое исследование коленных суставов. Статистическая обработка материала осуществлялась на персональном компьютере с помощью пакета статистических программ «Statistica» 6.0.

Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании относительно неизменного сустава установлено, что эпифизы сочленяющихся в суставе костей образованы, в основном, губчатой и частично компактной костью и покрыты суставным хрящом. Суставная полость представляет собой щелевидное пространство. Внутренний слой суставной сумки представлен синовиальной оболочкой преимущественно фиброзного типа, которая имеет вид тонкой пластинки состоящей из грубоволокнистой соединительной ткани, плотно соединенной с подлежащими соединительнотканными участками капсулы. Синовиальная оболочка содержит небольшое количество сосудов. Зональность в строении хряща выражена слабо, определяется слой хондроцитов и матрикса приблизительно одинаковой степени зрелости. Остеохондральное соединение представлено линией уплощенных клеток с базофильно окрашенной цитоплазмой.

Через 7 дней после моделирования ОА суставной хрящ имел неровную поверхность и неравномерную толщину. Местами его покровный слой отсутствовал, сохранялись только глубокие слои. Суставная полость представляла собой щелевидное пространство, в которое со стороны синовиальной оболочки врастала соединительная ткань, которая сужала суставную полость.

Через 7 дней после трех введений стволовых клеток после моделирования ОА определялись слабо выраженные дистрофические изменения хондроцитов, небольшая пролиферация синовиоцитов.

Через 1 неделю после введения стволовых клеток вместе с сывороткой после моделирования ОА определялись слабо выраженные дистрофические изменения хондроцитов, небольшая пролиферация синовиоцитов.

Через такой же срок после введения стволовых клеток вместе с сывороткой после моделирования ОА определялись слабо выраженные дистрофические изменения хондроцитов, небольшая пролиферация синовиоцитов. Морфологические параметры хондроцитов и синовиоцитов были сходны с таковыми в норме.

При использовании комбинации только стволовых клеток толщина суставного хряща на 2 и 3-й неделе эксперимента статистически значимо меньше возрастной нормы ($p < 0,05$), в то же время размер суставной щели на 3-й неделе после введения стволовых клеток не отличаются от параметров лабораторных животных в норме. Кроме того, в динамике эксперимента прогрессивно уменьшаются сосудистые реакции и степень воспаления ($p < 0,05$).

При использовании комбинации ОА+ сыворотка+ стволовые клетки на 2 и 3-й неделе эксперимента толщина суставного хряща и размер суставной щели не отличаются от параметров лабораторных животных в норме. Кроме того, в динамике эксперимента прогрессивно уменьшаются сосудистые реакции и степень воспаления ($p < 0,05$) (таблица 1).

Таблица 1 — Остеоартроз после введения сыворотки и стволовых клеток

Показатели	Серии исследований*		
	1	2	3
Толщина слоя синовиоцитов (мкм)	10,83 ± 2,57	9,28 ± 3,03	8,81 ± 1,19
Толщина слоя суставного хряща(мкм)	146,88 ± 19,32	203,85 ± 19,32	191,11 ± 18,98
Размер суставной щели (мкм)	79,12 ± 3,83	227,08 ± 23,03	233,89 ± 23,55
Пролиферативная активность хондроцитов по Ki-67, %	6,4 ± 2,01	6,9 ± 1,61	5,8 ± 1,14
Число сосудов в субинтимальном и стромальном слоях (в поле зрения) синовиальной оболочки(F VIII)	2,52 ± 0,56	2,15 ± 0,56	1,46 ± 0,27
Количество лимфоцитов вокруг капилляров синовиальной оболочки и подлежащей соединительной ткани в 10 полях/зр.	5,62 ± 0,48	3,21 ± 0,25	1,1 ± 0,16
Количество макрофагов вокруг капилляров синовиальной оболочки и подлежащей соединительной ткани в 10 полях/зр.	12,78 ± 0,24	11,5 ± 1,25	2,5 ± 1,46

Примечание: *серии исследований: 1) ОА + сыворотка 1 неделя; ОА + сыворотка + стволовые клетки 2 недели; ОА + сыворотка + стволовые клетки 3 недели.

Выводы

1. Введение в сустав стволовых клеток и комбинации стволовые клетки с сывороткой при экспериментальном ОА вызывает в суставном хряще комплекс сосудисто-мезенхимальные реакции, имеющие структурно-модифицированную направленность в отношении всех компонентов сустава и выражается в более высоких темпах регенерации хрящевой ткани сустава.

2. При введении комбинации сыворотки и стволовых клеток в сустав при экспериментальном ОА через 3 недели толщина и размер суставного хряща не отличаются от возрастной нормы. Воспалительная реакция в тот же срок наблюдения после введения выражена слабее (количество макрофагов и лимфоцитов) в сравнении с ОА без лечения ($p < 0,05$) и не отличается от показателей нормы.

3. Введение в сустав чистой культуры стволовых клеток имеет меньшую структурно-модифицированную направленность в сравнении с комбинацией стволовые клетки + сыворотки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев, Р. В. Анализ рынка клеточных препаратов для коррекции патологии скелетных тканей / Р. В. Деев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2006. — Т. 2, № 4. — С. 78–83.
2. Хрящ / В. Н. Павлова [и др.]. — М.: Медицина, 1988. — 320 с.
3. Николаев, В. И. Асептическая нестабильность ацетабулярного компонента эндопротезов: биофизические аспекты, диагностика, лечения и профилактика (клиническое и экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук / В. И. Николаев. — Минск, 2000.
4. Isolation, characterization, and culture of soft connective tissue stem / progenitor cells / C. W. Archer [et al.]; ed. R. I. Freshney, G. N. Stacey, J. M. Auerbach // Culture of human stem cells. — Wiley – Interscience, A. John Wiley and Sons Inc., 2007. — P. 187–206.
5. Николаев, В. И. Гистомодулирующее влияние сыворотки крови на структурные компоненты коленного сустава при экспериментальном остеоартрозе / В. И. Николаев, Э. А. Надыров, О. А. Голубев // Проблемы здоровья и экологии. — 2007. — № 4 (14). — С. 93–97.