

НОВЫЙ СПОСОБ ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТОВ СУСТАВНОГО ГИАЛИНОВОГО ХРЯЦА КОМБИНИРОВАННЫМ КЛЕТОЧНО-ТКАНЕВЫМ ТРАНСПЛАНТАТОМ

Г.П. Котельников, Л.Т. Волова, Ю.В. Ларцев, Д.А. Долгушкин, М.А. Тертерян

*Самарский государственный медицинский университет,
ректор – академик РАМН, д.м.н. профессор Г.П. Котельников
г. Самара*

Разработан новый способ восстановления поврежденного суставного хряща с помощью проведения пластики интраоперационных костно-хрящевых дефектов комбинированным аллогенным клеточно-тканевым трансплантатом на основе биологического пористого носителя и культуры клеток из стромы реберного хряща. Трансплантация аллогенных культур клеток хондробластов на деминерализованной спонгиозе «Лиопласт» обеспечивает формирование новой гиалиновой хрящевой ткани на месте дефекта и усиление развития микроциркуляторной сети в субхондральной кости. Гетеротопический принцип получения клеточного материала из гиалиновой хрящевой ткани позволяет уменьшить травматичность вмешательства на суставе.

Ключевые слова: суставной хрящ, дефекты, клеточно-тканевый трансплантат.

The new method of restoration of injured articular cartilage using plasty of intraoperative bone-cartilage defects with combined allograft based on biologic porous carrier and cell culture from stroma of costal cartilage was developed. The transplantation of allogenic culture of chondroblast cells on demineralized spongy substance «Lioplast» ensure the formation of hyaline cartilage tissue on the site of defect and amplified development of microcirculatory network in subchondral bone. The heterotopic principle obtaining cellular material allows to perform low-traumatic operations.

Key words: articular cartilage, defects, cellular-tissue graft.

С каждым годом растет число людей, страдающих заболеваниями крупных суставов. Среди них высок удельный вес пациентов с посттравматическими и деструктивными поражениями суставного хряща, среди которых часто встречаются полнослойные хрящевые и костно-хрящевые дефекты суставной поверхности, составляющие от 1,5 до 20% от всех видов повреждений хрящевой ткани [8]. Консервативные методы лечения больных с повреждениями суставного хряща малоэффективны. Из оперативных вмешательств наиболее распространена хондропластика дефектов суставной поверхности. Однако операции не всегда дают удовлетворительный результат [2, 3, 4, 6, 9].

В последнее время появились публикации об использовании клеток для восстановления поврежденной хрящевой ткани при выполнении хондропластики. Однако до конца не решены вопросы о выборе оптимального источника для получения клеточного материала и его дальнейшей доставки и фиксации в тканях-мишенях. По данным литературы, в качестве клеточного материала при лечении поражений хряща используют мезенхимальные стромальные клетки костного мозга и хондробласты из стромы суставного гиалинового хряща [1, 10, 11]. Среди носителей

для клеток распространены синтетические материалы, органические гели. Однако матрицы-носителя, обладающей хондроиндуктивными и хондрокондуктивными свойствами, до сих пор не найдено. Имеется мало литературных данных, касающихся экспериментального обоснования применения клеток при хондропластике дефектов суставного хряща [1, 5, 6, 9].

Цель исследования – разработка нового способа пластики дефектов суставного гиалинового хряща комбинированным аллогенным клеточно-тканевым трансплантатом на основе биологического пористого носителя и культуры клеток из стромы реберного хряща.

Для того чтобы применить разработанный новый способ пластики дефектов суставного гиалинового хряща в клинической практике, доказать его эффективность и безопасность в соответствии с основами законодательства об охране здоровья граждан РФ и международными этическими нормами [12] на базе ИЭМБ СамГМУ было проведено доклиническое экспериментальное исследование на животных.

Объектом стали кролики породы шиншилла массой 3,5–4 кг, в возрасте 2,5–3 года. Данное исследование является частью комплексной темы СамГМУ «Получение и применение культуры

хондробластов для лечения остеоартрозов», вошедшей в перечень научно-исследовательских работ, выполняемых федеральными государственными учреждениями науки и образования, подведомственными МЗ и СР РФ в 2009–2011 гг.» и утвержденной приказом МЗ и СР РФ № 257 от 20.05.2009.

В своей работе мы придерживались следующих основных положений:

- все исследования осуществлялись в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985);

- всех кроликов содержали в условиях стационарного вивария на растительном витаминизированном рационе при свободном доступе к воде;

- все животные перед работой были дегельминтизированы на момент начала и в течение всего срока эксперимента не имели признаков каких-либо интеркуррентных заболеваний;

- перед проведением эксперимента были определены границы биологической нормы для всех тестируемых показателей у интактных животных;

- оперативные вмешательства проводили в стерильных условиях с соблюдением правил асептики и антисептики;

- оперированных животных содержали по одиночке;

- для выведения животных из эксперимента применяли наркоз (одномоментное внутривенное введение летальной дозы тиопентала натрия).

Общее состояние животных оценивали клиническими методами: осмотр, наблюдение за поведением кролика, его активностью, определение массы тела. Измеряли и определяли окружность и подвижность в интактном суставе и суставе, на котором выполняли оперативное вмешательство.

Эксперимент проводили на 22 животных, разделенных на две группы. В первую (опытную) группу вошли 12 животных, у которых осуществляли операцию хондропластики дефектов гиалинового хряща комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами. Вторую группу составили 10 кроликов, у которых хондропластику дефектов коленных суставов не выполняли.

У всех кроликов создавали модель повреждения хрящевой ткани и субхондральной кости коленных суставов (рис. 1). Под гексеналовым наркозом открытым доступом с помощью зубо-врачебного бора при малых оборотах формировали 2 цилиндрических костно-хрящевых дефекта в области внутреннего и наружного мыщелков бедренной кости диаметром 2,5 мм, глубиной 5 мм.

Предварительно у 7 кроликов, не входящих в экспериментальные группы, осуществляли взя-

тие реберного хряща для получения аллогенного клеточного материала. Через линейный разрез вдоль нижнего пальпируемого ребра вблизи грудино-реберного сочленения с помощью острого скальпеля выполняли забор фрагмента реберного хряща размером 0,2×0,1 см, которые использовали для получения культуры клеток. Дефекты хряща не замещали. Для получения клеточных культур мы использовали среду 199 («БиолоТ») с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Выращивание фибробластоподобных клеток производили в культуральных флаконах «Corning» в термостате «Sanio-Incubator» MIR при температуре +37°С (рис. 2). Характер роста, пролиферативную активность и морфофункциональную оценку клеток в культуре исследовали с помощью комплекса общеморфологических, гистохимических и морфометрических методов. Выбор нами данного аллогенного клеточного материала был обусловлен особенностями хрящевой ткани, ее слабой антигенностью. Известна способность нативного донорского реберного хряща приживаться в организме реципиента и не отторгаться после его трансплантации.

В качестве матрицы-носителя для клеток была выбрана аллогенная деминерализованная спонгиоза, изготовленная в Самарском банке тканей ИЭМБ по технологии «Лиопласт» из губчатого вещества эпифизов длинных трубчатых костей взрослых кроликов. Данный носитель был выбран нами благодаря его пористости, особенностям гистоархитектоники и хорошей биорезорбируемости (рис. 3).

Процесс получения деминерализованной спонгиозы включал специальную ультразвуковую обработку тканей для удаления элементов костного мозга и жира, первичную стерилизацию материала, вирусную инактивацию. После первичной обработки ткани лиофилизировали, а затем герметично упакованный материал стерилизовали радиационным способом. Далее в лаборатории культивирования клеток ИЭМБ получали комбинированный клеточно-тканевый трансплантат.

Кроликам опытной группы интероперационные костно-хрящевые дефекты обоих мыщелков бедренной кости замещали аллогенным клеточно-тканевым трансплантатом, который дополнительно не фиксировали. После ушивания послеоперационной раны иммобилизацию конечности у кроликов не проводили. На данный способ получено положительное решение на выдачу патента № 2008149207/14(064538) от 12 октября 2009 г.

Материалом для исследования послужили образцы тканей коленного сустава животных,

полученные в ранние (2 недели) и поздние (3 и 6 месяцев) сроки эксперимента. Контролем служили 6 суставов, взятых у трех интактных животных для получения сведений о биологической норме изучаемых признаков.

При макроскопической оценке области хондроластики учитывали такие показатели, как восстановление формы суставной поверхности, степень восполнения дефектов суставного гиалинового хряща, размеры, цвет, однородность регенерата, сращение его с окружающим гиалиновым хрящом. Отмечали также сравнительную плотность регенерата при ощупывании тупым инструментом, прочность соединения его с подлежащей субхондральной костью, наличие дегенеративных изменений новообразованной ткани, окружающего и противолежащего суставного гиалинового хряща. Кроме оценки состояния суставных отделов костей, определяли (если имело место) реакцию воспаления синовиальной оболочки, образование ограничивающих подвижность рубцовых спаек.

Для микроскопической оценки полученный при биопсии материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, промывали в проточной воде в течение 24 часов, декальцинировали в растворе трилона В. Далее материал обезжиривали, обезвоживали, заливали в гистомиксовые блоки. Из них изготавливали серийные срезы толщиной 5–6 мкм на всю глубину блока (45 стекол на 1 блок). Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону.

Через **2 недели** у животных опытной группы в области пластики дефектов суставной поверхности хорошо визуализировались трансплантаты, покрытые тканью бледно-розового цвета. Они были отличны по цвету от окружающего суставного гиалинового хряща и доходили до его уровня. Отмечалось хорошее сращение между краями трансплантатов и тканью реципиента. При надавливании тупым инструментом трансплантаты были плотно фиксированы в субхондральной кости, но были более мягкими, чем окружающий суставной гиалиновый хрящ.

В эти же сроки у животных без выполнения хондроластики наблюдались дефекты гиалинового хряща правильной округлой формы, заполненные на $\frac{2}{3}$ глубины мягкой тканью розового цвета.

В подавляющем большинстве исследуемых коленных суставов животных в данные сроки синовиальная оболочка была утолщена, инъецирована сосудами, в полости содержалось повышенное количество прозрачной синовиальной жидкости светло-желтого цвета. Амплитуда движений в оперированных суставах составля-

ла около 50–70% от таковой в контралатеральных интактных суставах. Спаечный внутрисуставной процесс был выражен весьма умеренно и не имел каких-либо различий между исследуемыми группами.

На микроскопическом уровне в серийных срезах определяли пористый трансплантируемый материал, тесно спаянный с окружающими тканями. Отмечалась незначительная лимфоцитарная реакция. Прослеживали контуры трабекул пересаженной деминерализованной спонгиозы, все пространство которых было заполнено большим количеством активно пролиферирующих фибробластоподобных клеток (рис. 4 а). Клетки были продолговатой формы с двумя-тремя отростками, с центрально расположенным округлым ядром. Среди них имелись группы плазматических клеток с эксцентрично расположенным ядром и ярко розовой цитоплазмой.

Спустя **3 месяца** при осмотре животных опытной группы область пластики дефектов суставного гиалинового хряща была не различной, отмечалось хорошее сращение заметно уплотнившейся ткани регенератов с окружающим хрящом и подлежащей костью. Поверхность была ровной блестящей, признаков деструктивных изменений суставной поверхности не было (рис. 4 б).

Через 3 месяца в группе без выполнения хондроластики на суставных поверхностях можно было увидеть округлые вдавления со сглаженными краями глубиной до 1–2 мм. Дно углублений выстилала ткань белесоватого цвета, более эластичная при надавливании инструментом, чем гиалиновый хрящ и регенераты в зонах хондроластики у животных опытной группы. Во многих суставах наблюдали прогрессирование деструктивных изменений – тусклый цвет суставного хряща, появление растрескивания и разволокнения хряща вблизи зоны дефектов.

Внутрисуставные спайки в эти сроки выявляли в единичных оперированных суставах. Движения коленных суставов определялись с полной амплитудой за исключением наблюдений во второй группе животных при развитии деструктивных изменений, когда подвижность суставов восстанавливалась лишь до 60% от нормы.

Спустя **6 месяцев** в коленных суставах животных после пластики дефектов гиалинового хряща комбинированным клеточно-тканевым трансплантатом область операции не определялась и не отличалась от окружающей интактной суставной поверхности. Ткань регенерата по цвету и плотности соответствовала окружающему гиалиновому хрящу – была блестящей, белого цвета, без визуальных признаков дегенерации.



Рис. 1. Костно-хрящевые дефекты в области наружного и внутреннего мыщелков бедренной кости кролика

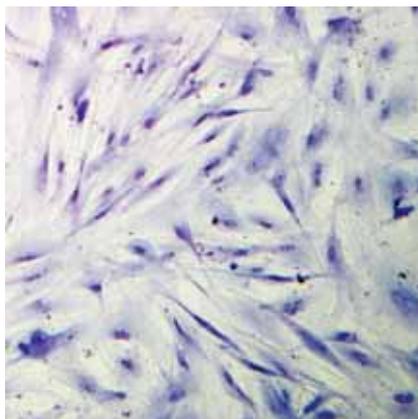


Рис. 2. Культура фибробластоподобных клеток из стромы реберного хряща кролика. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

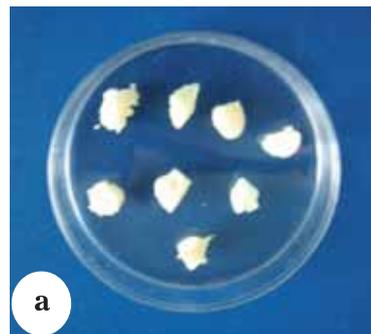


Рис. 3. Биоимплантат – лиофилизированная деминерализованная спонгиоза кролика: а – фото; б – микропрепарат. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

Микроскопически во всех серийных срезах у животных опытной группы суставная поверхность была представлена типичной структурой гиалиновой хрящевой ткани. В области операции к этому сроку имелась ровная поверхностная зона без видимых изъянов и волокнистых структур. В ней располагались несколько рядов мелких уплощенных хондроцитов. В промежуточной зоне определялись крупные клетки округлой

формы, расположенные в колонках, лежащих перпендикулярно к поверхности. Сосуды в хрящевом регенерате отсутствовали. В глубокой зоне суставного хряща четко определялись некальцинирующийся и кальцинирующийся слой, разделенные базофильной линией. В сформированной субхондральной кости пластинчатого строения определялось большое количество новообразованных кровеносных сосудов (рис. 4 в).

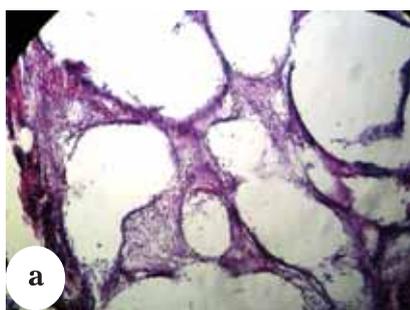


Рис. 4. Микро- и макропрепараты коленного сустава кролика после пересадки аллогенного клеточно-тканевого трансплантата: а – 2 недели после замещения дефекта клеточно-тканевым трансплантатом: идет процесс рассасывания биоимплантата; трабекулярные пространства заполнены пролиферирующими аллогенными фибробластоподобными клетками; б – 3 месяца: поверхностный слой хрящевой ткани ровный, блестящий, без изъянов; в – 6 месяцев: в области регенерата молодая гиалиновая хрящевая ткань, в субхондральной кости большое количество сосудов микроциркуляторного русла. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

В эти же сроки в группе животных без выполнения хондропластики дефицит заполнения дефектов относительно уровня гиалинового хряща составил 1–2 мм. Сформированный регенерат был серым и тусклым. Сохранялись и прогрессировали деструктивные изменения в суставах (рис. 5).



Рис. 5. Костно-хрящевой дефект без заполнения трансплантатом, 6 месяцев эксперимента: суставная поверхность деформирована, тусклая, визуализируются углубления в области мыщелков бедренной кости

Внутрисуставные спайки на данных сроках визуально не выявляли. Амплитуда движений в оперированных коленных суставах в опытной группе во всех случаях не отличалась от таковой в контралатеральных суставах.

Таким образом, полученные в эксперименте результаты свидетельствовали о безопасности и эффективности предложенного метода восстановления дефектов суставного гиалинового хряща.

Выводы

1. Разработан новый способ восстановления поврежденного суставного хряща с помощью проведения пластики интраоперационным костно-хрящевым дефектом комбинированным аллогенным клеточно-тканевым трансплантатом на основе биологического пористого носителя и культуры клеток из стромы реберного хряща.

2. Трансплантация аллогенных культур клеток хондробластов на деминерализованной спонгиозе «Лиопласт» обеспечивает формирование новой гиалиновой хрящевой ткани на месте дефекта и усиление развития микроциркуляторной сети в субхондральной кости.

3. Гетеротопический принцип получения клеточного материала из гиалиновой хрящевой ткани позволяет уменьшить травматичность вмешательства на суставе.

4. Резорбируемая аллогенная деминерализованная спонгиоза «Лиопласт» обеспечивает жизнеспособность и пролиферативную активность трансплантированных культур хондробластов и может быть рекомендована к использованию в качестве матрицы-носителя клеток.

Литература

1. Деев, Р.В. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития / Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш, Р.М. Тихилов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2007. — Т. II, № 4. — С. 18–30.
2. Ларцев, Ю.В. Новый лечебно-диагностический комплекс для больных гонартрозом : дис. ... д-ра мед. наук / Ларцев Ю.В. — Самара, 2007. — 349 с.
3. Маланин, Д.А. Пластика полнослойных дефектов покровного хряща коленного сустава цилиндрическими костно-хрящевыми ауто- и аллотрансплантатами / Д.А. Маланин, В.Б. Писарев, Л.Л. Черезов, А.М. Шауки Мохаммад // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. — 2000. — № 2. — С. 16–22.
4. Маланин, Д.А. Пластика полнослойных дефектов гиалинового хряща в коленном суставе: экспериментальные и клинические аспекты репаративного хондрогенеза : дис. ... д-ра мед. наук / Маланин Д.А. — Волгоград, 2002. — 513 с.
5. Миронов, С.П. Использование аутологичных хондроцитов для восстановления поврежденного суставного хряща / С.П. Миронов [и др.] // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. — 2008. — № 4. — С. 84–91.
6. Писарев, В.Б. Особенности репаративного процесса при пластике полнослойных дефектов покровного хряща в коленном суставе реберной надхрящницей / В.Б. Писарев, Д.А. Маланин, Л.Л. Черезов, А.М. Шауки Мохаммад // Анналы травматологии и ортопедии. — 2001. — № 1. — С. 12–16.
7. Сахаров, А.В. Использование первичной культуры фетальных хондробластов человека для ксенотрансплантации в дефект суставного хряща крыс / А.В. Сахаров [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2008. — № 3. — С. 136–140
8. Трачук, А.П. Артроскопическая диагностика и лечение больных с острым гемартрозом коленного сустава / А.П. Трачук, Р.М. Тихилов, Г.П. Соленьев, В.И. Черный // Сборник материалов III Конгресса РАО. — М., 2000. — С. 45–55.
9. Bobic, V. Current methods of treating articular cartilage defects in the knee an update on arthroscopic osteochondral autograft transplantation / V. Bobic // Arthroscopy. — 1998. — Vol. 2, Suppl. 1. — P. 10.
10. Wakitani, S. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cells transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knee / S. Wakitani [et al.] // Osteoarthr. Cartilage. — 2002. — Vol. 10, N 3. — P. 199–206.
11. Wakitani, S. Autologous bone marrow stromal cells transplantation for repair of full — thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports /

- S. Wakitani [et al.] // Cell. Transplant. – 2004. – Vol. 13, N 5. – P. 595–600.
12. World Medical association declaration of Helsinki: 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000.

Контактная информация:

Котельников Геннадий Петрович – академик РАМН, д.м.н. профессор ректор СамГМУ, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии;

Волова Лариса Теодоровна – д.м.н. профессор директор ИЭМБ СамГМУ

e-mail: csrl.sam@mail.ru;

Ларцев Юрий Васильевич – д.м.н. профессор доцент кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии;

Долгушкин Дмитрий Александрович – очный аспирант кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии;

Тертерян Маргарита Анатольевна – очный аспирант ИЭМБ СамГМУ.

THE NEW PLASTIC METHOD OF ARTICULAR HYALINE CARTILAGE DEFECTS WITH COMBINED CELLULAR-TISSUE GRAFT

G.P. Kotelnikov, L.T. Volova, Yu.V. Lartsev, D.A. Dolgushkin, M.A. Terteryan