

DOI: 10.15825/1995-1191-2015-1-86-96

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СУСТАВНОГО ХРЯЦА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ОСТЕОАРТРОЗА)

В.И. Севастьянов<sup>1</sup>, Г.А. Духина<sup>2</sup>, А.М. Григорьев<sup>1</sup>, Н.В. Перова<sup>2</sup>, Л.А. Кирсанова<sup>1</sup>,  
Н.Н. Скалецкий<sup>1</sup>, Д.Г. Ахаладзе<sup>1</sup>, С.В. Готье<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

**Целью** работы является исследование функциональной эффективности биомедицинского клеточного продукта, состоящего из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ), мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) и индукционной хондрогенной среды для регенерации суставного хряща. **Материалы и методы.** Использовали экспериментальную модель адъювантного артрита (кролики, самки, советская шиншилла) с дальнейшим развитием в остеоартроз (ОА) в сочетании с клиническими, биохимическими, рентгенологическими и гистохимическими исследованиями. **Результаты.** На 92-е сутки модели ОА обнаружено, что внутрисуставное введение БМКГ с МСК ЖТч в левый коленный сустав (n = 3) через 30 суток после моделирования ОА, в отличие от правого сустава (отрицательный контроль, n = 3), стимулирует процессы восстановления структуры хрящевой ткани, характеризующиеся формированием «колонок» хондроцитов, появлением во внутриклеточном матриксе изогенных групп и восстановлением его структуры. При введении в сустав БМКГ (n = 3) такие эффекты выражены значительно слабее. **Выводы.** Доказано наличие существенного регенеративного потенциала клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани человека (КИК ХТч). Можно предположить, что биостимулирующие свойства КИК ХТч обусловлены активирующим действием биомедицинского клеточного продукта на процессы миграции стволовых клеток из окружающих тканей в зону поражения с последующей их дифференцировкой.

*Ключевые слова:* остеоартроз, экспериментальная модель, гиалиновый хрящ, клеточно-инженерная конструкция, биополимерный матрикс, мезенхимальные стромальные клетки, жировая ткань.

## THE FUNCTIONAL EFFECTIVENESS OF A CELL-ENGINEERED CONSTRUCT FOR THE REGENERATION OF ARTICULAR CARTILAGE

V.I. Sevastianov<sup>1</sup>, G.A. Dukhina<sup>2</sup>, A.M. Grigoriev<sup>1</sup>, N.V. Perova<sup>2</sup>, L.A. Kirsanova<sup>1</sup>,  
N.N. Skaletskiy<sup>1</sup>, D.G. Akhaladze<sup>1</sup>, S.V. Gautier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> ANO «Institute of Biomedical Research and Technology», Moscow, Russia

**The aim** of this study is an analysis of the functional effectiveness of a biomedical cell product consisting of a biopolymer microheterogeneous collagen-containing hydrogel (BMCH), human adipose-derived mesenchymal stromal cells (hADMSCs), and chondrogenic induction medium in the regeneration of articular cartilage. **Materials and methods.** The test model of the adjuvant arthritis was used (female Soviet Chinchilla rabbits) with the further development into osteoarthrosis (OA) combined with the clinical, biochemical, radiological, and histochemical trials.

**Для корреспонденции:** Севастьянов Виктор Иванович. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Шукинская, д. 1. Тел. (499) 196 88 74. E-mail: viksev@yandex.ru.

**For correspondence:** Sevastianov Victor Ivanovich. Address: 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 196-88-74. E-mail: viksev@yandex.ru.

**Results.** On Day 92 of the OA model it has been found that the intra-articular introduction of a BMCH with hADMSCs into the left knee joint ( $n = 3$ ) 30 days after the OA modeling, as opposed to the right joint (negative control,  $n = 3$ ), stimulates the regenerative processes of the cartilaginous tissue structure characterized by the formation of chondrocyte «columns», the emergence of isogenic groups in the intracellular matrix and the regeneration of its structure. Upon the intra-articular introduction of a BMCH ( $n = 3$ ) such effects are markedly less pronounced. **Conclusions.** A significant regenerative potential of a cell-engineered construct of human articular tissue (CEC ATh) has been proven. It is possible to presume that biostimulating properties of CEC ATh are due to the activating effect of a biomedical cell product on the stem cell migration processes from the surrounding tissue into the injured area with their subsequent differentiation.

**Key words:** *test model, osteoarthritis, hyaline cartilage, cartilaginous tissue, cell-engineered construct, biopolymer matrix, mesenchymal stromal cells, adipose tissue.*

## ВВЕДЕНИЕ

Современные потребности в трансплантации существенно ограничиваются нехваткой донорских органов, и прогнозы указывают на то, что потребность в донорских органах и тканях будет только увеличиваться. Следовательно, актуальной остается задача разработки альтернативных способов компенсации или замены поврежденных или утраченных жизненно важных функций органов и тканей. В связи с этим в последние годы основной акцент сделан на использование технологий тканевой инженерии – междисциплинарной области исследований, которая включает разработку биоискусственных тканей и органов – материалов и систем, наделенных структурой и функцией биологических тканей [1].

Остеоартроз (ОА) – заболевание периферических, и/или центральных (позвоночных) суставов с деструкцией суставного хряща и дегенеративными изменениями в эпифизах сочленяющихся костей, с формированием субхондральных костных кист и краевых костных разрастаний [2]. В основе заболевания лежит изнашивание, истончение и гибель суставного хряща с выпадением его амортизационной функции. Заболеваемость остеоартрозом в России занимает лидирующее место среди болезней суставов и наблюдается практически во всех возрастных группах [2]. Распространенность ОА в нашей стране составляет более 20 на 1000 населения в возрастной группе от 18 лет и старше. Ежегодно в России регистрируется около 600 тыс. новых случаев остеоартроза. Прогнозируют, что к 2020 г. встречаемость ОА в популяции может достичь 57%. При этом наблюдается тенденция роста заболеваемости за счет возрастной группы моложе 45 лет.

Независимо от этиологии заболевания поражение хрящевой ткани суставов является основным фактором в патогенезе остеоартроза. Лечение дефектов суставного хряща представляет собой сложную ортопедическую проблему. Отсутствие кровоснабжения и низкий уровень метаболизма из-за малого количества клеток в единице объема ткани приводят к тому, что полноценная репаративная регенерация хряща возможна лишь при небольших по

площади повреждениях [3]. При обширных повреждениях хрящевой ткани (ХТ), сопровождающихся разрушением надхрящницы, регенерацию хрящевой ткани опережает развитие грануляционной ткани в месте дефекта [4]. Применение таких техник, как стимуляция костного мозга, субхондральное просверливание кости, микропереломы и попытка закрытия дефекта надкостничными или перехондральными трансплантатами, не всегда приводит к приемлемым результатам [5].

Наибольший интерес в последние годы исследователи проявляют к разработке клеточных технологий для лечения поврежденной хрящевой ткани суставов [6, 7]. Большая часть из них (табл. 1) основана на введении в зону дефекта в виде суспензии или на матриксах аутологичных хондроцитов (АХ), полученных у пациента артроскопической биопсией. При такой технологии в восстановлении поврежденной хрящевой ткани принимают участие имплантированные АХ, предшественники хондроцитов из лоскута надкостницы и МСК.

В качестве примера можно рассмотреть препарат Carticel® (Genzyme Biosurgery, США) [8], представляющий собой культуры аутологичных хондроцитов, полученные из биопсии здорового хряща. Данная технология является первым клеточным продуктом для лечения повреждений хрящевой ткани в клинике. Альтернативой использования Carticel® является другой препарат той же компании – МАСИ® (Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implant), который находится на III фазе клинических исследований. Главное отличие данного препарата от Carticel® заключается в том, что для закрытия дефекта используют мембрану из очищенного бычьего коллагена I/III типа, а не аутологичный лоскут надкостницы. В качестве биодеградируемых матриц (табл. 1) в основном служат компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, гиалуроновая кислота и ее производные, хондроитинсульфат), перспективным является использование функциональных тканевых заменителей [8, 18, 19].

Однако методы клеточной и матриксной имплантации аутологичных хондроцитов не лишены

Таблица 1

**Характеристика основных биомедицинских клеточных продуктов  
для лечения дефектов хрящевой ткани [9]**

| Название продукта      | Компания-изготовитель, страна, ссылка                           | Описание продукта   | Фаза клинического внедрения       |
|------------------------|---|---|-----------------------------------|
| Carticel®              | Genzyme corp.<br>США [8]  | АХ  | Широкое клиническое использование |
| MACI®                  |   | Мембрана из животного коллагена I типа с АХ   | III фаза клинических испытаний    |
| Chondrogen®            | Osiris Therapeutics Inc.,<br>США [9]                            | МСК   | II фаза клинических испытаний     |
| Chondro Celect®        | Tigenix N.V., Бельгия [10]                                      | АХ  | III фаза клинических испытаний    |
| BioSeed®-C             | BioTissue Technologies GmbH<br>Германия, Швейцария, Италия [11] | Матрикс на основе сополимера полигликолевой/полимолочной кислоты с полидиоксаном, содержащий АХ | Широкое клиническое использование |
| CaReS                  | Arthro Kinetics<br>Германия [12]                                | Матрикс из коллагена I типа, полученного из крысиных хвостов с АХ                               | Широкое клиническое использование |
| Hyalograft C autograft | Anika therapeutics,<br>Великобритания [13]                      | Матрикс из эстерифицированной производной гиалуроновой кислоты с АХ                             | Широкое клиническое использование |
| ARTROcell 3D®          | co.don AG, Германия [14]  | АХ  | Клиническое использование         |
| Cartilink™-1           | Interface Biotech A/S<br>Дания [15, 16]                         | АХ  | Клиническое использование         |
| Cartilink™-2           |   | Пересадка АХ, закрытых коллагеновой мембраной   | Клиническое использование         |
| NOVOCART™              | Tetec Tissue Engineering Technologies AG<br>Германия [17]       | АХ  | Клиническое использование         |
| NOVOCART™3D            |   | Матрикс из коллагена и хондроитинсульфата и АХ  | Клиническое использование         |

недостатков [19], к основным из которых относятся травматичность биопсии здорового участка хряща и возможность дедифференцировки хондроцитов в условиях *in vitro*, включая фибробластоподобную перестройку. Кроме того, имплантированные аутологичные хондроциты часто формируют волокнистый, а не гиалиновый хрящ, что приводит только к частичному восстановлению хрящевой ткани. В связи с этим в качестве альтернативы исследуются варианты замены аутологичных хондроцитов на мезенхимальные стромальные клетки (МСК) (табл. 1), которые обладают мультилинейным потенциалом дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях [9, 20].

Одним из перспективных подходов к лечению ОА является стимулирование восстановительных процессов поврежденного суставного хряща путем введения *in situ* биомедицинского клеточного продукта в виде клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани (КИК ХТ), включающей в себя следующие компоненты [21]:

- биodeградируемый биополимерный матрикс с биостимулирующими свойствами, выполняющий роль временного биоискусственного внеклеточного матрикса;
- мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из эндогенных источников у пациента (ау-

тологичные клетки) или от доноров (аллогенные клетки) и способные формировать функционирующий внеклеточный матрикс (ВКМ);

- биоактивные молекулы (цитокины, факторы роста), стимулирующие пролиферативный и дифференцировочный потенциал МСК.

Наибольший интерес как источник МСК представляет жировая ткань (ЖТ) благодаря простоте технологии выделения, достаточному выходу клеток и минимальной травматичности для пациента. Было показано, что МСК ЖТ адгезивны к поверхности культурального пластика, фибробластоподобны, по совокупности поверхностных антигенов соответствуют фенотипу мезенхимальных стромальных клеток, обладают способностью к мультилинейной дифференцировке в мезенхимальные линии [22, 23].

Учитывая ранее доказанную биологическую безопасность клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани человека (КИК ХТч), состоящей из биополимерного микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ), мезенхимальных стромальных клеток человека (МСК ЖТч) и индукционной хондрогенной среды [24], а также высокую пролиферативную и дифференцировочную активность МСК ЖТч при их культивировании в течение 42 суток на БМКГ [25], можно предполо-

жить перспективность использования КИК ХТч для регенерации поврежденного суставного хряща.

Целью данной работы является исследование функциональной эффективности биомедицинского клеточного продукта на основе БМКГ, МСК ЖТч и индукционной хондрогенной среды для регенерации суставного хряща на экспериментальной модели остеоартроза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клеточно-инженерная конструкция хрящевой ткани человека

#### *Получение и культивирование МСК ЖТч*

Мезенхимальные стромальные клетки получали из образцов подкожно-жировой клетчатки человека по стандартной методике, описанной ранее [26]. Кратко: жировую ткань отмывали от крови в фосфатно-солевом растворе с добавлением антибиотиков, механически измельчали до получения гомогенной массы, которую затем обрабатывали раствором коллагеназы Type IA (Sigma, # C98891, США) из расчета 600 ед/г ткани. Фермент инактивировали ростовой средой (РС) для мезенхимальных стволовых клеток человека MesenPRO RS™ без глутамина, с ростовыми добавками MesenPRO RS™ Growth Supplement (Gibco® by Life Technologies™, USA). Клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 15 мин. Осадок фильтровали через набор фильтров с диаметром пор 100 мкм и 70 мкм, ресуспендировали в РС и рассеивали в культуральные флаконы (Corning-Costar, США). Культивирование осуществляли в стандартных условиях: при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1)% CO<sub>2</sub>. Замену РС проводили каждые 3 суток. Визуально культуру оценивали с помощью инвертированного микроскопа (Micros MC700, Австрия). Для получения КИК ХТч использовали МСК ЖТч 2 – 3 пассажей.

#### *Биополимерный гидрогелевый коллагенсодержащий матрикс*

В качестве биodeградируемого матрикса был выбран зарегистрированный в России биополимерный микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) – композиция гетерогенного имплантируемого геля (торговый знак *Сферо*®ГЕЛЬ, ФСР 2012/13033 от 01.02.2012 г., производитель ЗАО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Россия). *Сферо*®ГЕЛЬ содержит практически все компоненты внеклеточного матрикса тканей сельскохозяйственных животных, обладает высокими биосовместимыми и биостимулирующими свойствами и предназначен для замещения дефектов мягких тканей, включая применение в клеточных технологиях [21]. Инъекционная фор-

ма матрикса *Сферо*®ГЕЛЬ выпускается в шприцах. Время биорезорбции БМКГ составляет от нескольких недель до нескольких месяцев в зависимости от условий и места имплантации.

#### *Клеточно-инженерная конструкция хрящевой ткани*

Клеточно-инженерную конструкцию хрящевой ткани (КИК ХТч) оптимального состава, доказанного в экспериментах *in vitro* [25], получали непосредственно перед введением в сустав. В стерильный двухмиллилитровый шприц, содержащий 1 мл БМКГ, прогретый в термостате до 37 °С, набирали 1 мл суспензии МСК ЖТч 2–3 пассажей, приготовленной в индукционной хондрогенной среде STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (Invitrogen, USA). На мешалке «Вортекс» осуществляли перемешивание КИК ХТч в шприце. Конечная концентрация МСК ЖТч в БМКГ составляла 2 × 10<sup>6</sup> кл/мл матрикса. Непосредственно до манипуляций по внутрисуставному введению КИК ХТч шприцы находились в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при t 37 °С, но не более 2 ч.

### Животные и их содержание

В экспериментах использовали кроликов (самки) советская шиншилла, весом 3–3,5 кг, полученных из питомника лабораторных животных ФГУП ОПХ «Манихино», Московская область. Кроликов содержали в металлических клетках по 1 особи. Количество животных – 8. Маркировка животных – индивидуальная.

Кормление проводили комбинированным кормом для лабораторных грызунов. Микробиологический статус кормов соответствует Ветеринарно-санитарным нормам и требованиям к качеству кормов для непродуктивных животных и не оказывает негативного влияния на результаты проводимого теста. Животные получали корм без ограничения. В качестве питья была фильтруемая водопроводная вода в стандартных питьевых бутылочках. Микробиологический статус воды соответствует СанПиН 2.1.4.1074-01 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения». В комнате содержания животных поддерживались постоянные условия окружающей среды: температура 15–18 °С, 50–65% относительная влажность, 12-часовой цикл освещения и 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час. Температуру и влажность регистрировали и документировали один раз в сутки.

Животных лишали корма на ночь перед взвешиванием, забором крови и эвтаназией. Доступ к воде не ограничивался.

Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, исполь-

зюемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986).

### **Экспериментальная модель адьювантного артрита**

В существующих экспериментальных моделях ОА факторы, вызывающие патологические изменения суставного хряща, условно можно разбить на три группы [27]. Дистрофические и деструктивные нарушения в суставах могут быть достигнуты: путем введения в сустав химических веществ (например, гидрокортизона ацетат); физическим воздействием на сустав паражидкостной струей азота; механическими (нагрузка на сустав, иммобилизация сустава) и травматическими повреждениями (дырчатый дефект, рассечение передней связки, скарификация участка суставного хряща, по заранее заготовленному шаблону) и др. Выбор той или иной модели зависит от цели исследования. При оценке функциональной эффективности КИК ХТч нам не было необходимости учитывать патогенез ОА, например, нарушение трофики суставного хряща. В связи с поставленной целью работы экспериментальная модель ОА должна была достоверно и надежно приводить к дистрофическо-деструктивным изменениям гиалинового хряща. Для доказательства возможности репаративной регенерации хрящевой ткани при внутрисуставном введении КИК ХТч была выбрана экспериментальная модель адьювантного артрита [28, 29] с дальнейшим развитием в артроз.

### **Дизайн исследования**

Все экспериментальные животные были разбиты на 3 группы. Животные группы 1 (3 кролика) и группы 2 (3 кролика) были использованы для создания экспериментальной модели остеоартроза. На 30-е сутки после моделирования ОА кроликам группы 1 в коленный сустав задней левой лапы вводили 0,5 мл КИК ХТч, а кроликам группы 2 в том же количестве в коленный сустав задней левой лапы вводили БМКГ. В обеих группах коленный сустав задней правой лапы служил контролем (модель артроза). Для сравнительного анализа были использованы интактные кролики – 3-я группа (2 кролика, 4 сустава). Перед внутрисуставным введением КИК ХТч и БМКГ кроликов группы 1 и 2 однократно иммуносупрессировали Сандиммуном (содержание активного вещества циклоспорина 50 мг/мл) в дозе 5 мг/кг. Для обезболивания при внутрисуставном введении образцов БМКГ и КИК ХТч использовали лидокаин-спрей. Продолжительность наблюдения за животными после внутрисуставного введения

образцов БМКГ и КИК ХТч составляла около 2 месяцев. Общая продолжительность эксперимента ~120 суток.

Для подтверждения развития артрита и его перехода в артроз были проведены клинические, гематологические, рентгенологические и гистологические методы исследования.

### **Создание экспериментальной модели адьювантного артрита**

Протокол модели адьювантного артрита состоял из 3 этапов:

- 1) подкожное введение (в основание хвоста) 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) (Thermo scientific) с метилированным бычьим сывороточным альбумином (БСА, Sigma) в концентрации 4 мг/мл;
- 2) повторное подкожное введение 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда с метилированным БСА (м-БСА) в концентрации 4 мг/мл через 2 недели;
- 3) внутрисуставное введение 0,5 мл метилированного БСА в концентрации 2 мг/мл в 7,5% растворе глюкозы через 4 недели в оба коленных сустава задних конечностей кролика после первой подкожной инъекции.

### **Ключевые даты**

Дата инициации исследования: 26.09.2013 г.

Дата завершения исследования: 21.01.2014 г.

Продолжительность исследования: 118 суток.

Дата первого подкожного введения суспензии м-БСА с ПАФ – 26.09.2013 г.

Дата второго подкожного введения суспензии м-БСА с ПАФ – 10.10.2013 г.

Дата внутрисуставного введения м-БСА – 24.10.2013 г.

Дата первого рентгенологического исследования суставов – 17.11.2013 г. (25-е сутки после моделирования ОА, или 53-и сутки от начала эксперимента).

Дата внутрисуставного введения КИК ХТч и БМКГ – 17.11.2013 г. (25-е сутки после моделирования ОА, или 53-и сутки от начала эксперимента).

Дата второго рентгенологического исследования суставов и завершения эксперимента – 21.01.2014 г. (66 суток после внутрисуставного введения КИК ХТч и БМКГ).

### **Наблюдения и измерения в ходе исследования**

#### *Наблюдения за животными*

В течение исследования вели наблюдение за каждым животным. Осмотр включал в себя: внешний вид, состояние шерстного покрова, глаз, носа, характер дыхания, поведение, реакцию на внешние

раздражители, болевую реакцию, потребление корма и воды, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания и цвет мочи.

#### **Клинические исследования**

1. Измерение объема коленного сустава (с помощью сантиметровой ленты).
2. Измерение локальной температуры (с помощью бесконтактного термометра фирмы Rycor).

#### **Лабораторные исследования**

1. Клинический анализ крови: определение СОЭ, количество лейкоцитов.
2. Биохимический анализ крови: определение содержания С-реактивного белка в сыворотке крови.

Забор крови производили из краевой вены уха после 18 часов голодания. Для клинического анализа кровь отбирали в специальные пробирки «Юнивет» с антикоагулянтом ЭДТА. Анализы проводили на гематологическом анализаторе «Медоник» для ветеринарии (Швеция). Для биохимических анализов кровь отбирали в специальные пробирки с гранулами для отделения сыворотки. Биохимический анализ проводили унифицированным методом на биохимическом анализаторе «Стат факс 4500+» (США) с использованием стандартного набора реагентов CRP FS (фирма DiaSys).

#### **Рентгенологические исследования**

Рентгенологические исследования выполняли на аппарате АРД-2 в двух стандартных взаимно перпендикулярных проекциях (прямой и боковой) до начала создания экспериментальной модели, на 25-е и 90-е сутки моделирования ОА.

#### **Терминальные процедуры**

Через 66 суток после введения КИК ХТч и БМГ проводили эвтаназию всех групп животных методом воздушной эмболии с предварительной анестезией препаратом «Золетил 100» фирмы «Virbac» в дозе 10 мг/кг.

#### **Гистологические исследования**

Перед приготовлением гистологических препаратов суставные поверхности оценивали макроскопически (форма, контур, цвет).

Фрагменты костей бедра и голени вместе со структурами коленного сустава фиксировали в 10% растворе забуференного формалина не менее 48 часов, декальцинировали в электролитном декальцинирующем растворе (фирма «Лабпоинт», Россия) в течение 48–72 часов, обезвоживали через БЛИ и заключали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, изучали на световом микроскопе Nikon (Япония) при увеличении 200 и 400.

#### **Обработка данных**

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m), которые представлены в итоговых таблицах. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica ver. 7.0. Достоверность отличий между группами данных оценивали с применением t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **Клинические наблюдения**

##### **Внешний вид и поведение**

Во всех группах животные выглядели здоровыми, охотно поедали корм, реагировали на внешние раздражители, проявляли интерес к людям. Мышечный тонус не отличался повышенной возбудимостью. Кролики были средней упитанности, истощением не страдали. Шерстный покров густой, ровный и блестящий, выпадения шерсти не выявлено. Дыхание ровное, обычного ритма, незатрудненное. Частота мочеиспускания, цвет мочи, желудочно-кишечные показатели, мышечный тонус, рефлексы, зоосоциальное поведение соответствовали физиологической норме.

На 25-е сутки моделирования ОА у животных наблюдали беспокойство при передвижении, хромоту при активных движениях. Этот факт свидетельствует о болевых ощущениях в области пораженного коленного сустава. При измерении объема движений в суставе отмечали их ограниченность.

#### **Клинические исследования**

На протяжении эксперимента кроликам четырежды измеряли объем коленных суставов и локальную температуру. Результаты измерений приведены в табл. 2. Увеличение объема и локальной температуры на 7-е сутки после моделирования ОА свидетельствует о развивающемся артрите.

#### **Гематологические исследования**

Для подтверждения наличия артрита у кроликов на 7-е сутки после моделирования ОА определяли СОЭ, количество лейкоцитов в крови и С-реактивного белка в сыворотке крови. Данные приведены в табл. 3. Установлено, что у всех кроликов с моделируемым ОА все изучаемые показатели достоверно выше, чем у контрольных.

#### **Рентгенологические исследования**

На 25-е и 90-е сутки моделирования кроликам делали рентген коленных суставов (рис. 1). Для сравнения, на рис. 1, а, приведены рентгенограмма

Таблица 2

**Данные клинического осмотра кроликов**

| Срок, сутки от создания модели | Интактные кролики (n = 2) |              | Кролики с моделью артрита |               |               |               |
|--------------------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                                |                           |              | КИК ХТч (n = 3)           |               | БМКГ (n = 3)  |               |
|                                | Локальная температура, °С |              |                           |               |               |               |
|                                | Л                         | П            | Л                         | П             | Л             | П             |
| Исходные данные                | 37,20 ± 0,15              | 37,30 ± 0,05 | 36,90 ± 0,35              | 37,0 ± 0,3    | 37,50 ± 0,45  | 37,40 ± 0,25  |
| 7-е сутки                      | 37,20 ± 0,05              | 37,30 ± 0,05 | 38,50 ± 0,55*             | 38,50 ± 0,58* | 38,00 ± 0,25* | 38,2 ± 0,3*   |
| 25-е сутки                     | 37,1 ± 0,1                | 37,2 ± 0,0   | 37,50 ± 0,32              | 37,4 ± 0,3    | 37,3 ± 0,2    | 37,8 ± 0,3    |
| 90-е сутки                     | 36,50 ± 0,05              | 36,7 ± 0,05  | 36,50 ± 0,09              | 36,50 ± 0,12  | 37,0 ± 0,4    | 36,7 ± 0,0    |
| Объем коленного сустава, см    |                           |              |                           |               |               |               |
| Исходные данные                | 11,80 ± 0,25              | 11,50 ± 0,55 | 12,00 ± 0,29              | 11,80 ± 0,33  | 12,0 ± 0,0    | 11,80 ± 0,25  |
| 7-е сутки                      | 11,30 ± 0,25              | 11,80 ± 0,75 | 13,30 ± 0,44*             | 13,80 ± 0,33* | 12,5 ± 0,0*   | 12,80 ± 0,25* |
| 25-е сутки                     | 11,80 ± 0,25              | 11,80 ± 0,25 | 12,20 ± 0,33              | 12,50 ± 0,29  | 12,0 ± 0,0    | 12,5 ± 0,0    |
| 90-е сутки                     | 14,5 ± 0,0                | 14,80 ± 0,25 | 15,7 ± 0,6                | 15,30 ± 0,73  | 14,80 ± 0,25  | 14,80 ± 0,75  |

Примечание. \* – различие в сравнении с контролем значимо по t-критерию Стьюдента (p < 0,05). Л – левый сустав; П – правый сустав.

Таблица 3  
**Гематологические показатели крови кроликов на 7-е сутки после моделирования АО**

| Показатель                     | Интактные кролики | Кролики с моделью артрита |               |
|--------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|
|                                |                   | КИК ХТч                   | БМКГ          |
| СОЭ (мм/час)                   | 1,00 ± 0,00       | 2,67 ± 0,33*              | 4,67 ± 0,67*  |
| Лейкоциты (10 <sup>9</sup> /л) | 6,35 ± 0,15       | 8,9 ± 0,839*              | 9,97 ± 0,65*  |
| С-реактивный белок (мг/л)      | 3,90 ± 0,70       | 10,24 ± 1,782*            | 10,50 ± 1,23* |

Примечание. \* – различие в сравнении с контролем значимо по t-критерию Стьюдента (p < 0,05).

задних коленных суставов интактного кролика и характерные рентгенограммы на 25-е сутки моделирования ОА для животных группы 1 (рис. 1, б).

На рентгеновских снимках обнаружено неравномерное сужение суставной щели в медиальных областях обоих коленных суставов для обеих групп кроликов (сравни рис. 1, а, и рис. 1, б), что подтверждает начало развития гонартроза.

На 90-е сутки (66-е сутки после введения в левые суставы КИК ХТч (группа 1) и БМКГ (группа 2) эффективность воспалительного процесса снизилась (рис. 3). Вместе с тем на рентгенограммах визуально не было обнаружено существенной разницы между правыми и левыми коленными суставами в обеих группах животных.

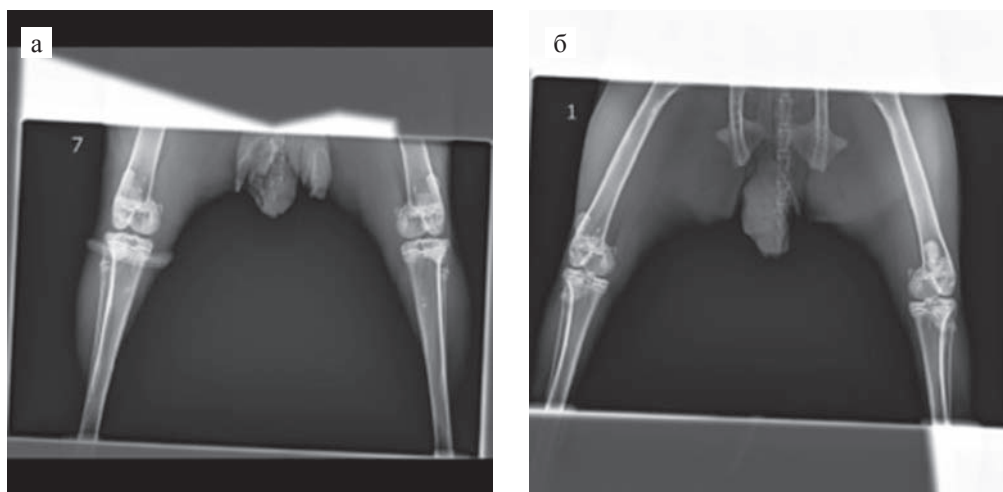


Рис. 1. Рентгеновские снимки на 25-е сутки после моделирования ОА: а – интактное животное (кролик № 7); б – модель остеоартроза (кролик № 1, группа 1)

## Гистологические исследования

Гистологический анализ результатов эксперимента был проведен на 30 препаратах (образцах). В гистологических препаратах хряща интактных кроликов коленного сустава большой берцовой кости и бедренной кости наблюдается характерная для гиалинового хряща гистологическая структура (рис. 2).

Отчетливо видны поверхностный, средний (промежуточный) и глубокий слои. В поверхностном слое визуализируется бесклеточная пластина, под которой располагаются вытянутой уплощенной и овальной формы клетки – хондробласты и молодые хондроциты. В среднем слое в эозинофильном тонковолокнистом матриксе хондроциты часто образуют вертикальные колонки-столбики, являющиеся характерной структурой суставного хряща, наиболее заметной в большой берцовой кости (рис. 2, а). В глубоком слое, граничащем с субхондриальной костью, выявляются округлой формы хрящевые клетки.

По принятому дизайну эксперимента в правом коленном суставе, который служил отрицательным контролем, патологический процесс ОА развивался в течение всего времени эксперимента (118 суток). В левый коленный сустав на 53-е сутки после начала моделирования ОА кроликам группы 1 выполняли внутрисуставное введение образцов КИК ХТч, а кроликам группы 2 – образцов БКМГ. На 66-е сутки после введения препаратов животных выводили из эксперимента.

Для животных обеих групп наиболее ярко выраженные изменения структуры хрящевой ткани при моделировании ОА отмечены для суставного хряща большой берцовой кости. В хряще бедренной кости животных морфологические изменения выглядят менее выраженными. Несмотря на некоторое кле-

точное оскудение среднего слоя, частично сохраняются хрящевые колонки, но более короткие, чем в хрящевой ткани сустава интактного кролика. Не наблюдается грубого разволокнения матрикса. Более того, для одного животного из этой группы морфологическая картина практически соответствовала норме.

В связи с этим в дальнейшем мы анализировали сравнительный регенеративный потенциал БКМГ и КИК ХТч на гистологических препаратах левых коленных суставов большой берцовой кости.

У всех животных группы 1 ( $n = 3$ ) в хряще из правого коленного сустава большой берцовой кости обнаруживаются морфологические признаки измененной структуры (рис. 3, а). Наблюдаются изъязвления и слущивания поверхностной пластины. Деструктуризация более глубоких слоев выражается в обеднении матрикса клетками, связанном с гибелью (цитоллизом) хондроцитов, появлением клеток с пикнотичными ядрами, пустых лакун, исчезновении колончатого строения, хаотичном расположении хрящевых клеток, отеке и очаговом разволокнении хрящевого матрикса.

В гистологических препаратах хряща из левого коленного сустава опытной группы 1 (рис. 3, б) с введенной КИК ХТч на 53-е сутки моделирования ОА (118-е сутки после начала эксперимента) обнаруживаются признаки частичного восстановления структуры хряща, выражающиеся в формировании хондроцитами колонок-столбиков в среднем слое, некотором оживлении поверхностного слоя (увеличение количества клеток), появлении изогенных групп хрящевых клеток в матриксе. Матрикс хряща в препаратах (рис. 3, б) выглядит более однородным по сравнению с матриксом отрицательного контроля (рис. 3, а), без признаков разволокнения.

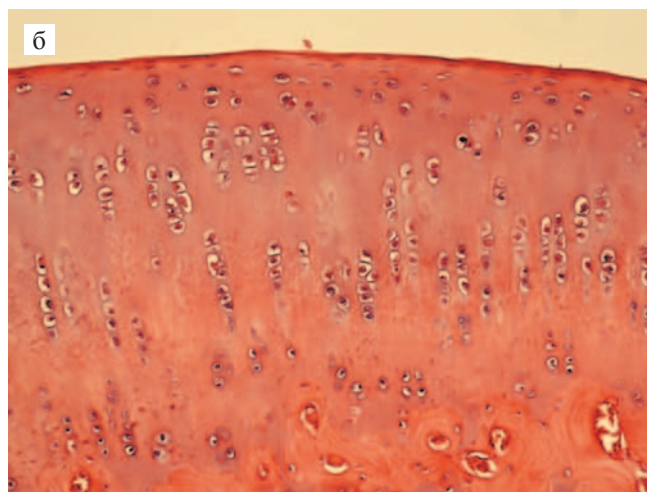
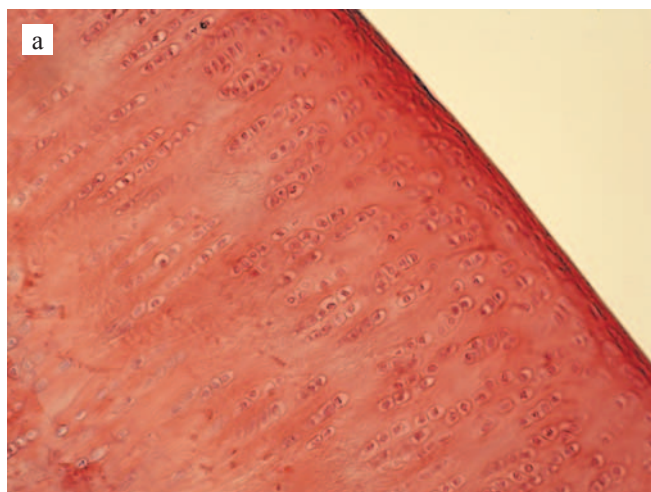


Рис. 2. Гистологическая структура гиалинового хряща интактных кроликов: а – коленный сустав большой берцовой кости; б – коленный сустав бедренной кости. Окраска – гематоксилин и эозин.  $\times 200$



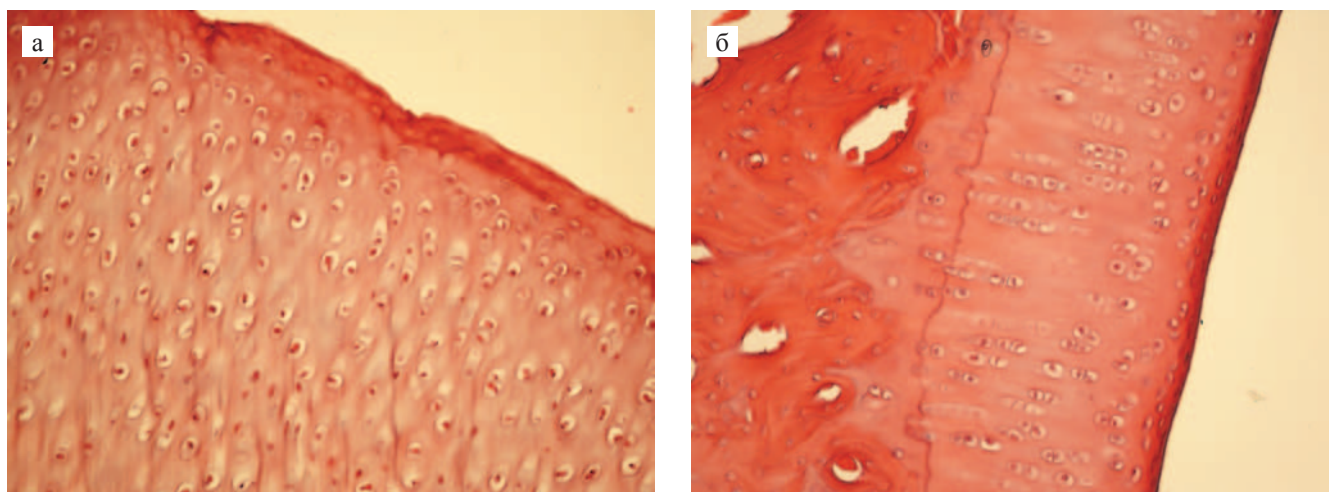


Рис. 3. Гистологическая структура хряща суставов большой берцовой кости кролика из опытной группы 1 экспериментальной модели ОА на 118-е сутки от начала эксперимента: а – правый коленный сустав через 90 суток после моделирования ОА (отрицательный контроль); б – левый коленный сустав через 90 суток после моделирования ОА и 66 суток после внутрисуставного введения КИК ХТч. Окраска – гематоксилин и эозин.  $\times 200$

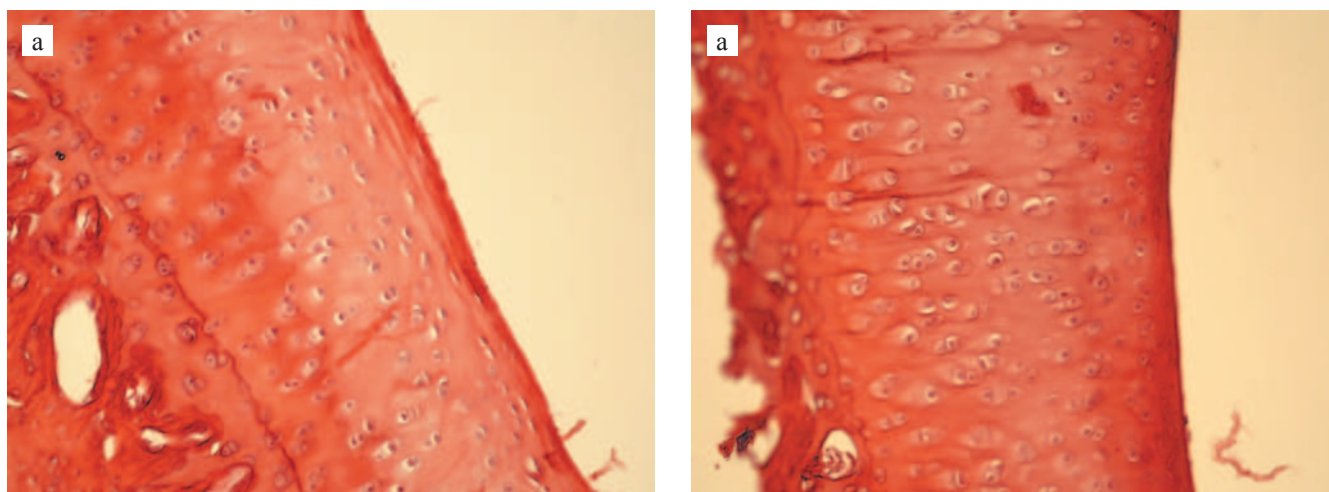


Рис. 4. Гистологическая структура хряща сустава большой берцовой кости кролика из опытной группы 2 в экспериментальной модели ОА на 118-е сутки от начала эксперимента: а – правый коленный сустав через 90 суток после моделирования ОА (отрицательный контроль); б – левый коленный сустав через 90 суток после моделирования ОА и через 66 суток после внутрисуставного введения БМКГ. Окраска – гематоксилин и эозин.  $\times 200$

Как и для животных группы 1 ( $n = 3$ ), для опытной группы 2 ( $n = 3$ ) в хряще из правого коленного сустава большой берцовой кости обнаруживаются четкие морфологические признаки измененной структуры (рис. 4, а).

Гистологическая картина хряща правого коленного сустава (отрицательного контроля) практически совпадает с таковой в опытной группе 1. Деструктивные изменения затрагивают все слои хрящевой ткани (рис. 4, а). Наблюдается изъязвление поверхностного слоя, клеточное оскудение, связанное с гибелью хрящевых клеток, и хаотичное расположение сохранившихся хондроцитов в матриксе. В препаратах хряща левого коленного сустава (рис. 4, б) в отличие от группы 1 морфологические различия, по сравнению с гистологической картиной отрицатель-

ного контроля (рис. 4, а) выражены слабо. Можно отметить лишь тенденцию к формированию колонок-столбиков, также более сохранным выглядит поверхностный слой гиалинового хряща.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, достоверно значимые морфологические различия структуры гиалиновых хрящей зафиксированы в 1-й группе экспериментальных животных с моделированным ОА. При введении КИК ХТч в левый коленный сустав в отличие от правого сустава (отрицательный контроль) наблюдается тенденция к восстановлению структуры хрящевой ткани большой берцовой кости, характеризующаяся формированием «колонок» хрящевых

клеток, появлением в матриксе изогенных групп и восстановлением структуры самого матрикса (процессы аппозиционного и интерстициального роста). Во 2-й группе экспериментальных животных, которым в левый коленный сустав вводили БМКГ, такой эффект выражен значительно слабее. Полученный результат свидетельствует о наличии существенного регенеративного потенциала биомедицинского клеточного продукта КИК ХТч. Можно предположить, что регенерационная активность КИК хрящевой ткани обусловлена их активирующим действием на процессы миграции стволовых клеток из окружающих тканей в зону поражения с последующей их дифференцировкой.

Заметим, по данным рентгенологических исследований нельзя было судить ни о динамике развития ОА коленных суставов, ни о процессах репаративной регенерации гиалинового хряща при внутрисуставном введении биомедицинского клеточного продукта КИК ХТч.

Матрикс БМКГ относится к биоактивным биомиметическим гидрогелям [30], функциональная эффективность которого была доказана, например, при лечении гонартроза [31, 32]. При проведении проспективного, двойного слепого, плацебо-контролируемого, рандомизированного исследования при внутрисуставном введении БМКГ (композиция *Сфера*<sup>®</sup>ГЕЛЬ, ЗАО «БИОМИР сервис», Россия) было достоверно установлено его положительное действие у пациентов с гонартрозом в течение не менее 3 месяцев: уменьшение боли и улучшение функциональной активности сустава при хорошей переносимости инъекции препарата [32].

Как следует из полученных результатов, регенеративная активность КИК ХТч в экспериментальной модели гонартроза намного выше, чем у БМКГ, что позволяет надеяться на перспективность клинического применения биомедицинского клеточного продукта для лечения ОА.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки в рамках Соглашения № 14.610.21.0001 в части разработки экспериментальной модели остеоартроза и финансовой поддержке РФФ в рамках гранта №14-25-00055 в части проведения гистоморфологического анализа.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Atala A, Lanza R, Thompson J, Nerem R.* Principles of regenerative medicine. Academic Press is an imprint of Elsevier, First edition; 2008.
2. Ревматология. Национальное руководство. Под ред. *Насонова ЕЛ, Насоновой ВА.* Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010: 720. Rheumatology. National handbook. Eds. *Nasonov EL, Nasonova VA.* GEOTAR-Media: Moscow, 2010.
3. *Melero-Martin JM, Al-Rubeai M.* In vitro expansion of chondrocytes. *Topics in Tissue Engineering.* 2007; 3: 37.
4. *Мазуров ВИ.* Болезни суставов. СПб.: СпецЛит, 2008: 27–31. *Mazurov VI.* Joint disease. SPb: SpetsLit, 2008: 27–31.
5. *Деев РВ.* Анализ рынка клеточных препаратов для коррекции патологии скелетных тканей. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2006; 2 (4): 78–83. *Deev RV.* Market analysis of cell preparations for correction of the pathology of the skeletal tissues. *Cell Transplantology and Tissue Engineering.* 2006; 2 (4): 78–83.
6. *Jones DG., Peterson L.* Autologous chondrocyte implantation. In the book: *Cartilage repair strategies.* Ed. by Williams RJ. Humana Press, Totowa, New Jersey. 2007: 137–166.
7. *Сургученко ВА.* Матрицы для тканевой инженерии и гибридных органов. *Биосовместимые материалы (учебное пособие).* Под ред. *Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП.* Москва: МИА, 2011. Ч. II; гл. 1: 199–228. *Surguchenko VA.* The matrices for tissue engineering and hybrid organs. *Biocompatible materials (textbook).* Ed. by: *Sevastianov VI, Kirpichnikov MP.* Moscow: MIA, 2011; 2 (1): 199–228.
8. <http://www.genzyme.com>
9. <http://www.osiristx.com>
10. <http://www.tigenix.com>
11. <http://www.biotissue.de>
12. <http://www.arthro-kinetics.com>
13. <http://www.anikatherapeutics.com>
14. <http://www.codon.de>
15. <http://www.aci.dk>
16. *Husing B, Buhrlen B, Gaisser S.* Human Tissue Engineered Products – Today's Markets and Future Prospects, Annex of the Final Report for Work Package 1: Analysis of the actual market situation – Mapping of industry and products, Fraunhofer Institute for Systems and Innovation Research, Karlsruhe, Germany. 2003: 54.
17. <http://www.tetec-gmbh.de>
18. *Chung C, Burdick JA.* Engineering Cartilage Tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60 (2): 243–262.
19. *Redman SN, Oldfield SF, Archer CW.* Current strategies for articular cartilage repair, *European Cells and Materials.* 2005; 9: 23–32.
20. *Danišovič L, Lesný P, Havlas V, Teyssler P, Syrová Z, Kopáni M et al.* Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Applied Biomedicine.* 2007; 5: 139–150.
21. *Севастьянов ВИ, Перова НВ, Немец ЕА, Сургученко ВА, Пономарева АС.* Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине. *Биосовместимые материалы (учебное пособие).* Под ред. *Севастьянова ВИ, Кирпичникова МП.* М.: МИА, 2011. Ч. II, гл. 3: 237–252. *Sevastianov VI, Perova NV, Nemets EA, Surguchenko VA, Ponomareva AS.* *Biocompatible materials (textbook).* Ed. by: *Sevastianov VI, Kirpichnikov MP.* Moscow: MIA. 2011; 2 (3): 237–252.
22. *Пономарева АС, Сургученко ВА, Богданова НБ., Можейко НП., Севастьянов ВИ.* Исследование диф-

- ференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека. *Вестник Саратовского государственного технического университета*. 2011; 1 (53): 215–220. Ponomareva AS, Surguchenko VA, Bogdanova NB, Mozhejko NP, Sevastianov VI. The study of differentiation potential of mesenchymal stromal cells from human fat tissue. *Vestnik Saratovskogo gosudarstvennogo tehničeskogo universiteta*. 2011; 1 (53): 215–220.
23. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell W, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001; 17 (1): 211–228.
24. Севастьянов ВИ, Духина ГА, Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Перова НВ, Скалецкий НН. Биомедицинский клеточный материал для регенерации суставного хряща: биосовместимые и гистоморфологические свойства (экспериментальная модель подкожной имплантации). *Перспективные материалы*. 2014; 10: 28–39. Sevastianov VI, Dukhina GA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Perova NV, Skaletskiy NN. A biomedical cell product for the regeneration of articular cartilage: Biocompatible and histomorphological properties (An experimental model of subcutaneous implantation). *Perspective materials*. 2014; 10: 28–39.
25. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Skaleckij NN, Sevastianov VI. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (in vitro study). *J. Biomed. Mater. Research*. 2015; 103A (2): 463–470.
26. Егорова ВА, Пономарева АС, Богданова НБ, Абрамов ВЮ, Севастьянов ВИ. Характеристика фенотипа МСК из жировой ткани человека методом проточной цитометрии. *Технологии живых систем*. 2009; 6 (5): 40–46. Egorova VA, Ponomareva AS, Bogdanova NB, Abramov VYu, Sevastianov VI. Characteristic phenotype MSC from the fatty tissue of humans by flow cytometry. *Technologies of living systems*. 2009; 6 (5): 40–46.
27. Макушин ВД, Степанов МА, Ступина ТА. Экспериментальное моделирование остеоартроза коленного сустава у собак. *Биомедицина*. 2012; 3: 108–115. Makushin VD, Stepanov MA, Stupina TA. Experimental modeling of knee joint osteoarthritis in dogs. *Biomedicine*. 2012; 3: 108–115.
28. Vallon R, Freuler F et al. Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and transcription of matrix metalloproteinases. *Immunology*. 2001; 166: 2801–2807.
29. Шиманский ВА, Кушнир ВА, Фролов ВИ, Крашенинников МЕ, Баранова ОВ, Онищенко НА. Применение аутологических клеток костного мозга для торможения разрушения структуры хряща при остеоартрозе коленных суставов. *Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органических дисфункций*. Под ред. Шумакова ВИ, Онищенко НА. М.: ЛАВР, 2009; гл. 10: 213–224. Shimansky VA, Kushnir VA, Frolov VI, Krashennnikov IU, Baranova S, Onishchenko NA. The use of autologous bone marrow cells for inhibition of the destruction of the structure of cartilage in osteoarthritis of the knee. *Biological reserves bone marrow cells and correction of organ dysfunction*. Ed. Shumakov VI, Onishchenko NA. M.: LAVR, 2009; Ch. 10: 213–224.
30. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering*. 2014; Part A, 20 (5, 6): 895–898.
31. Севастьянов ВИ, Перова НВ, Сайковский РС, Соловьева ИВ. Применение инъекционных форм биополимерных гетерогенных гидрогелей при дегенеративно-дистрофических поражениях суставов: Практическое пособие для врачей. М.: Триада, 2012: 27. Sevastianov VI, Perova NV, Sajkovskij RS, Solov'eva IV. The use of injectable biopolymer heterogeneous hydrogels with degenerative-dystrophic lesions of the joints. *Practical manual for doctors*. M.: Triada; 2012.
32. Сайковский РС, Савенкова НА, Аверьянов АВ, Лисица АВ. Эффективность применения препарата Сферогель для лечения гонартроза. *Клиническая практика*. 2013; 3: 4–10. Sajkovskiy RS, Savenkova NA, Averyanov AV, Lisitsa AV. The effectiveness of Spherogel in the treatment of knee osteoarthritis. *Klinicheskaya praktika*. 2013; 3: 4–10.

Статья поступила в редакцию 03.02.2015 г.