



ПРИМЕНЕНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ЦЕЛЬЮ СПОНДИЛОДЕЗА

Сергей Макаревич,

заведующий нейрохирургическим отделением №1 РНПЦ травматологии и ортопедии, доктор медицинских наук, доцент; sv.mak@mail.ru

Андрей Мазуренко,

заведующий лабораторией травматических повреждений позвоночника и спинного мозга РНПЦ травматологии и ортопедии, кандидат медицинских наук, доцент; mazurenko@mail.ru

Кирилл Криворот,

старший научный сотрудник лаборатории травматических повреждений позвоночника и спинного мозга РНПЦ травматологии и ортопедии, кандидат медицинских наук; kirill.doc@mail.ru

Андрей Малашенко,

врач-нейрохирург нейрохирургического отделения №1 РНПЦ травматологии и ортопедии; mallat2012@mail.ru

Михаил Потапнев,

заведующий отделом клеточных биотехнологий РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, доктор медицинских наук, профессор; potapnev@blood.by

Светлана Космачева,

заведующий лабораторией биологии и генетики стволовых клеток РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, кандидат медицинских наук, доцент; kosmacheva@blood.by

Наталья Данилкович,

научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий; nndanilkovich@gmail.com

Александра Ионова,

младший научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий; al_ionova96@mail.ru

УДК 616.419-018.4-089.843:616.711-089.22

Аннотация. Несмотря на успехи в хирургии позвоночника, псевдоартроз остается актуальной проблемой. Оптимизировать лечение этой патологии можно с помощью трансплантата на основе клеточных технологий. В рамках задания «Разработка и внедрение метода спондилодеза с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток» (2017–2020 гг.) создан биотрансплантат на основе аутологичных МСК костного мозга; установлена наиболее подходящая доза МСК для биотрансплантата (не менее 300×10^3 клеток на $см^2$); описано влияние плазмы, обогащенной тромбоцитами (ПОРФТ), на пролиферативную активность МСК на коллагеновой губке (добавление 5% ПОРФТ приводит к увеличению синтеза мРНК фактора транскрипции (Run X), щелочной фосфатазы и остеопонтина в 15,4, 1,4 и 13,2 раза соответственно); предложен способ получения остеогенного биомедицинского клеточного продукта для формирования биотрансплантата; составлена программа клинических испытаний, на основании которой прооперирован один пациент.

Ключевые слова: спинальная хирургия, спондилодез, псевдоартроз, аутологичные мезенхимальные стволовые клетки, биотрансплантат, спондилолистез.

Для цитирования: Макаревич С., Мазуренко А., Криворот К., Малашенко А., Потапнев М., Космачева С., Данилкович Н., Ионова А. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток с целью спондилодеза // Наука и инновации. 2019. №11. С. 79–84. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-11-79-84>

В хирургии позвоночника широко применяется внутренняя фиксация, что способствует костному сращению и, соответственно, улучшению результата лечения. В поясничном отделе позвоночника в основном используются винтовая транспедикулярная фиксация, закрепление тел позвонков пластинами, а также замещение их костными (ауто-, аллогенными) трансплантатами [1]. Для изготовления имплантатов предпочтительны титан и его сплавы, поскольку они наиболее биосовместимы с человеческими тканями, а также приемлемы по прочности и коррозионной

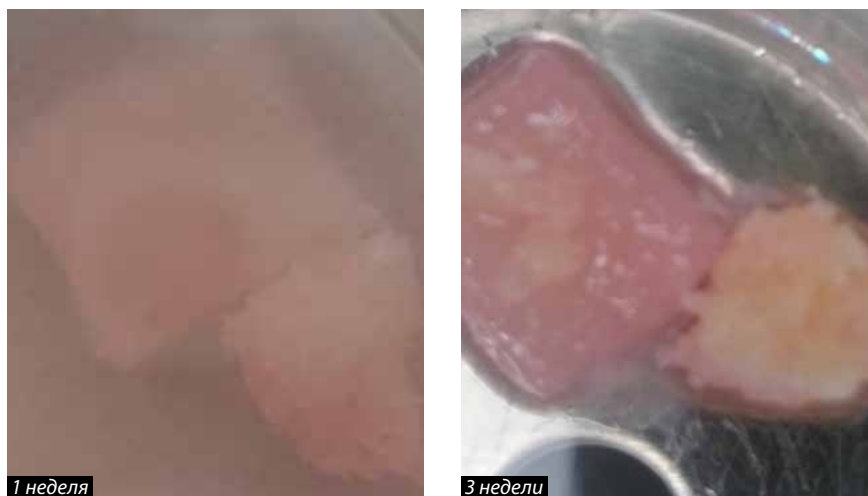


Рис. 1. Компоненты биотрансплантата при культивировании в лунках планшета

устойчивости в физиологической среде [2, 3]. Альтернативой пересадке кости для регенерации незаживающих дефектов являются клеточные технологии, остеогенные факторы роста и бесклеточные подложки или имплантация костных эквивалентов (при комбинации клеток, подложек и факторов роста). Независимо от способа терапии для регенерации кости необходимо наличие следующих условий: остеоиндуктивные сигналы, матрикс с адгезивной поверхностью, который задерживает их, и остеогенные клетки, которые прикрепляются к матриксу и дифференцируются в остеобласты в ответ на сигналы [4].

Поскольку эффективных имплантов для восстановления дефектов позвоночника до сих пор не предложено, актуально создание трансплантата на основе клеточных технологий.

Нами разработан метод ауто-трансплантации аутологичных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и проведены его клинические испытания. Предварительно были выполнены культуральные, морфологические, ги-

стохимические, молекулярно-генетические исследования.

На цитотоксичность (совместимость с культурой клеток) протестированы биокомпозитные материалы (пластины, гранулы, гель) «Коллапан» (Россия), «Остеоматрикс» (Россия) и коллагеновая губка «Лиостипт» (Испания). Их в виде навесок по 10 мг предварительно стерилизовали в течение 30 мин при 120 °С. Затем образцы помещали в 24-луночный планшет, заливали полной питательной средой (ППС) на основе α -МЕМ, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1% антибиотиков, и выдерживали 24 часа. Оценивали токсичность в отношении МСК как самих биоматериалов (отмытых и неотмытых), так и их супернатантов, полученных после 24-часового инкубирования. МСК за 22–24 часа до внесения материалов высевали по $1,0 \times 10^5$ в лунки планшета для прикрепления клеток к ростовой поверхности. После культивирования из лунок удаляли среду, помещали в них приготовленные образцы, добавляли свежую ППС в объеме 200 мкл и культивировали при 37 °С и 5% CO_2 .

Контролем служили МСК в ППС без материалов в аналогичных полевой концентрации и условиях культивирования. Планшет инкубировали 22–24 ч (сутки) и 168 ч (7 суток). Количество жизнеспособных клеток по окончании эксперимента оценивали с помощью колориметрического теста МТТ.

Из дозы концентрата тромбоцитов по описанной в работе [5] методике получали плазму, обогащенную растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ). Ее влияние на направленную остеогенную дифференцировку МСК костного мозга человека в 3D-конструкции на коллагеновой губке оценивали по увеличению синтеза мРНК транскрипционного фактора (Run X), щелочной фосфатазы (ALP) и остеопонтина (OSP) методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Для определения соотношения компонентов в биотрансплантате коллагеновую губку «Лиостипт» размером 1,5×1 см помещали в 6-луночный планшет. МСК 1-го пассажа, преддифференцированные в остеогенном направлении в течение 7 дней, высевали на губку в полевой концентрации 600×10^3 клеток. Также в лунки планшета вносили фрагменты губчатой кости весом около 100 мг (± 5 –8 мг) и культивировали в полной питательной среде на основе среды альфа-МЕМ с 5% АВ (IV) сыворотки и 5% ПОРФТ от 1 до 3 недель. Смену среды осуществляли дважды в неделю. Морфологию биотрансплантата *in vitro* оценивали под световым инвертированным микроскопом; количество жизнеспособных клеток считали по исключению трипанового синего после снятия их с помощью 0,025% раствора

Трипсин-ЭДТА; жизнеспособность МСК на коллагеновой губке определяли под флуоресцентным микроскопом при окрашивании красителем Hoesst 3334 для прижизненной визуализации МСК в составе биотрансплантата.

Методика получения остеогенного биомедицинского клеточного продукта (БМКП) для формирования биотрансплантата

Лабораторная подготовка. Для создания биотрансплантата использовали аутологичные МСК костного мозга пациента, выращенные в полной питательной среде с применением сыворотки АВ (IV) крови человека [5].

Дифференцировку клеток в остеогенном направлении проводили с добавлением в питательную среду 10 мМ/мл β -глицерофосфата, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 0,1 μ М/мл дексаметазона и 5% ПОРФТ в течение 6–7 дней со сменой среды через 3 дня. Затем клетки отмывали физиологическим раствором для инъекций, снимали с поверхности флакона 0,25% раствором трипсин-ЭДТА, дважды отмывали физраствором хлорида натрия с 1% аутологичной сывороткой, ресуспендировали в объеме 2 мл физраствора с добавлением 5% аутологичной сыворотки пациента.

Для контроля качества полученного БМКП считали количество клеток, определяли их жизнеспособность, подлинность (иммунофенотип по маркерам CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺ и CD105⁺), стерильность.

Тестирование биокомпозитов «Коллапан» (пластины, гранулы, гель), «Остеоматрикс» и коллагеновой губки «Лиостипт»,

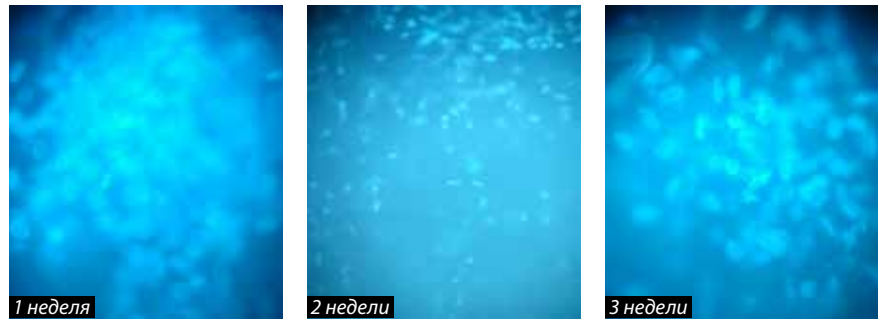


Рис. 2. МСК на коллагеновой губке при прижизненном окрашивании

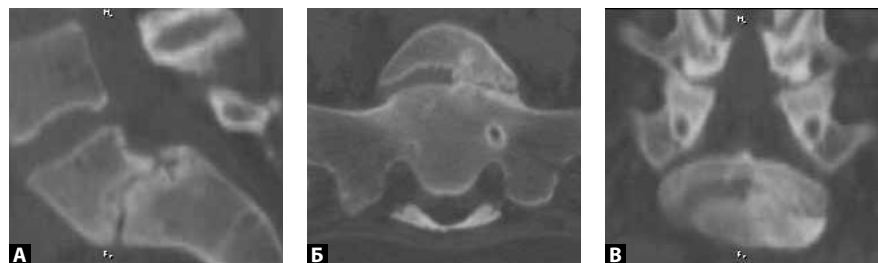


Рис. 3. Рентгеновская компьютерная томография сегмента позвоночника (L5-S1) пациентки Д. до операции: А – сагиттальный скан, Б – трансверсальный, В – фронтальный

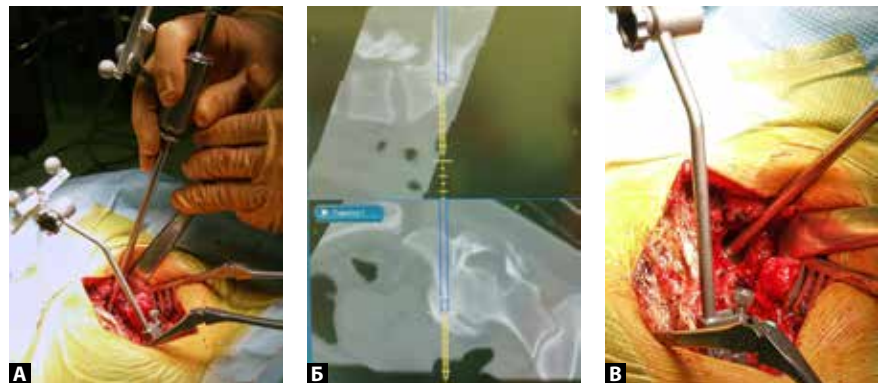


Рис. 4. Формирование костного канала: А – метчик компьютерной хирургической навигации, Б – изображение на мониторе КХН, В – формирование канала фрезой

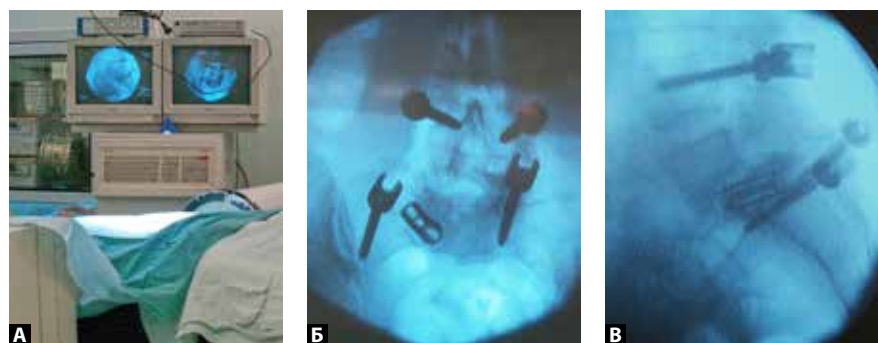


Рис. 5. Титановый кейдж установлен под контролем электронно-оптического преобразователя: А – общий план, Б – боковая проекция, В – прямая проекция

использующихся в хирургической практике, на биосовместимость с клетками показало, что эти материалы вызывают гибель менее 30% МСК *in vitro*; при оценке острой токсичности жизнеспособность клеток варьировала от 87,6 до 89,0% при прямом контакте и от 82,7 до 100% – их супернатантов. Показатели были сопоставимы с контрольным – образца МСК, выращенного в полной питательной среде. При продлении культивирования МСК с биоматериалами до 7 суток клетки адаптируются на поверхности материалов и начинают пролиферировать. Таким образом, для создания биотрансплантата для регенерации костного дефекта возможно использование гранул «Коллапана» или «Остеоматрикса» как материалов, обладающих остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами, в комбинации с коллагеновой губкой.

При создании тканеинженерных конструкций для поддержания жизнеспособности МСК

необходимо присутствие в трансплантате ростовых факторов, малых молекул. В качестве их источника нами выбрана 5% ПОРФТ. Ее добавление в остеогенную дифференцировочную среду, в которой МСК находятся на коллагеновой губке, значительно усиливает синтез мРНК Run X (в 15,4 раза), ALP (в 1,4) и OSP (в 13,2 раза) на 4-й день остеогенной индукции клеток. Через 7 дней экспрессия Run X повышается еще в 1,5 раза, ALP – в 2,3 раза, OSP – в 7,2 раза. То есть оптимальный срок для преддифференцировки МСК – 7 дней. За это время происходит экспрессия остеогенных маркеров, но еще не образуются оссификаты кальция.

Основными компонентами трансплантата являются аутологичные МСК, преддифференцированные в остеогенном направлении; аутологичная измельченная кость; коллагеновая губка; ПОРФТ. Для определения оптимального соотношения проведено их совместное культивирование *in vitro* в течение 3 недель в 3 экспериментах, как описано

выше. Через неделю образовался гель. Через 3 недели он стал плотным и покрыл все компоненты биотрансплантата. Между губчатой костью и коллагеновой губкой образовался тяж из клеток (рис. 1).

Абсолютное количество МСК в составе биотрансплантата в конце 1-й и 2-й недель культивирования *in vitro* уменьшилось незначительно по отношению к начальному объему высеянных остеогенно дифференцированных МСК (600 тыс.) и составило $557,50 \pm 24,75$ тыс. и $530,00 \pm 49,50$ тыс. соответственно. Через 3 недели с коллагеновой губки (матрицы Лиостипт) удалось снять только $380,00 \pm 7,07$ тыс. клеток. Это объясняется формированием между костью и губкой плотного тяжа клеток и невозможностью извлечь их для подсчета.

При окрашивании флуоресцентным красителем Hoechst 3334 среди нитей коллагеновой матрицы наблюдалось равномерное заселение жизнеспособными МСК на всех сроках культивирования (рис. 2).



Рис. 6. Заполнение титанового кейджа:
А – гемостатическая губка, Б – флакон с ПОРФТ и пробирка с МСК, В – введение МСК

Таким образом, в экспериментах *in vitro* показана возможность использования в качестве матрицы всех изучаемых материалов. На 1 см³ любого из них необходимо наносить от 3 до 10 млн клеток. Добавление 5% ПОРФТ в дифференцировочную среду значительно усиливает синтез специфических остеогенных маркеров МСК.

Коллективом авторов разработан протокол клинического испытания метода аутотрансплантации МСК, в котором отражена актуальность, ожидаемый эффект, критерии включения и исключения из исследования, стадии и условия проведения, измеряемые показатели, перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении хирургической операции и пути их устранения, методы сбора данных.

Клиническая апробация. По разработанной методике в ноябре 2018 г. на базе РНПЦ травматологии и ортопедии прооперирована пациентка Д. 1993 года рождения (история болезни №7531, нейрохирургическое отделение №1 РНПЦ травматологии и ортопедии) с диагнозом «Спондилолистез L5 позвонка II ст., состояние после хирургического лечения в 2011, 2013 и в феврале 2018 г. Псевдоартроз в сегменте L5-S1. Стойкая люмбагия». В октябре 2018 г. в РНПЦ травматологии и ортопедии она обратилась в связи с усилением болей в спине. В ходе обследования выявлен спондилолистез L5 позвонка II степени, нестабильная форма. В анамнезе: пациентка считает себя больной с 2010 г., когда появились боли в поясничном отделе позвоночника. В 2011 г. на базе РНПЦ травматологии и ортопедии оперирована двухэтапно (1-й этап – задний спондилодез

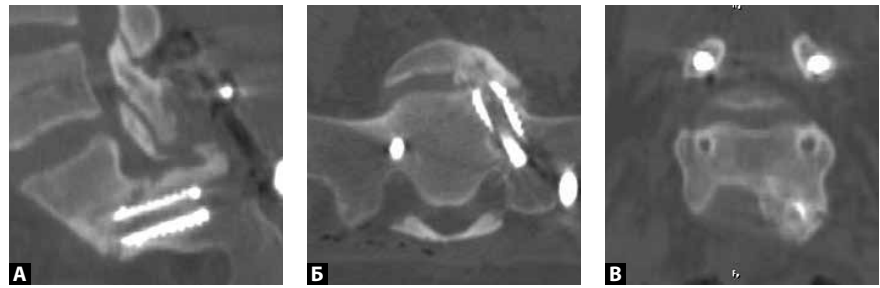


Рис. 7. РКТ сразу после операции:

А – сагиттальный скан, Б – трансверсальный скан, В – фронтальный скан

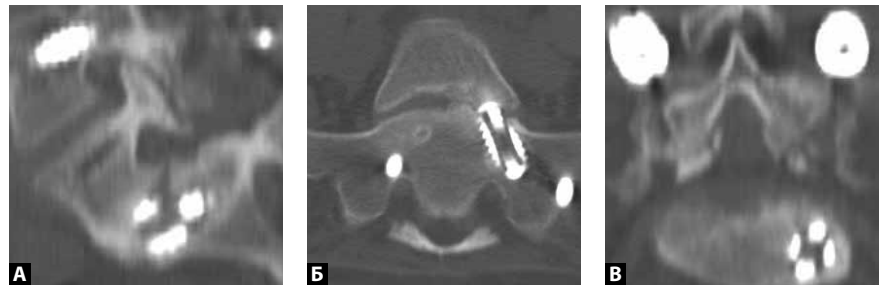


Рис. 8. РКТ через 3 мес. после операции:

А – сагиттальный скан, Б – трансверсальный скан, В – фронтальный скан



Рис. 9. РКТ через 6 мес. после операции:

А – сагиттальный скан, Б – трансверсальный скан, В – фронтальный скан

L5-S1 с использованием транспедикулярного фиксатора, 2-й – передний межтеловой спондилодез L5-S1 аутотрансплантатом). В 2013 г. в связи с сохраняющимся болевым синдромом и отсутствием сращения в сегменте L5-S1 пациентке была выполнена «заднебоковая декомпрессия корешков спинного мозга на уровне L5-S1 позвонков слева, перемонтаж металлоконструкции, задний спондилодез L5-S1 аутотрансплантатом». В феврале 2018 г. в связи

с дискомфортом от выступающих под кожей элементов металлоконструкция была удалена, женщина была выписана.

При повторном обращении: на момент осмотра боль в спине сохраняется. Рентгеновская компьютерная томография (РКТ): в сегменте L5-S1 костное сращение отсутствует (рис. 3). Пациентка госпитализирована. За три недели до оперативного вмешательства ей выполнена пункция костного мозга, полученный материал

перевезен в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, где проведено выделение и наращивание МСК, в ноябре 2018 г. женщина была прооперирована: выполнена задняя стабилизация L4-S1 транспедикулярным фиксатором, задний межтеловой спондилодез титановым кейджем под контролем компьютерной хирургической навигации с трансплантацией аутологичных МСК.

Описание операции. Скелетирование заднего опорного комплекса в сегменте L4-L5-S1 и установка транспедикулярных винтов в позвонки L4 и S1 проведены по общепринятой методике. Слева в сегменте L5-S1 под контролем компьютерной хирургической навигации (КХН) фрезой, острыми ложками, кусачками, кюретками сформирован костный канал, ведущий через S1 сегмент крестца и L5-S1 межпозвоночный диск к позвонку L5 (рис. 4).

В сформированный канал под контролем электронно-оптического преобразователя установлен титановый кейдж, заполненный гемостатической губкой, ПОРФТ и аутологичными МСК, привезенными из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий заблаговременно (рис. 5, 6). Спереди и сзади кейджа уложены фрагменты аутокости, полученные на этапе декомпрессии.

Пациентка вертикализована на 2-е сутки после операции. Восстановительный период проходил без осложнений. Отмечался субъективный регресс болевого синдрома. РКТ: стояние элементов металлоконструкции корректное (рис. 7).

Первый осмотр, через 3 месяца после операции. Пациентка оценивает результат операции как

хороший; отмечает незначительный болевой синдром в поясничном отделе позвоночника и в ногах в покое и при движении. РКТ 06.02.2019 г.: формируется костный блок, стояние металлоконструкции корректное (рис. 8). Клинико-функциональный результат хирургического лечения оценивается как хороший.

Второй осмотр, через 6 месяцев после операции. Отвечая на вопрос о своем самочувствии, женщина говорит лишь о незначительной болезненности в области стояния металлоконструкции. РКТ 20.05.2019 г.: сформировался костный блок,

стояние металлоконструкции корректное (рис. 9). Клинико-функциональный результат лечения – хороший.

Таким образом, в процессе выполнения исследования выбран оптимальный имплантат в качестве носителя биомедицинского клеточного продукта, разработаны условия, способствующие адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток на матриксе, определены клинические требования к свойствам трансплантата. Путем проведения клинического испытания доказана эффективность разработанного метода аутоотрансплантации МСК. ■

■ **Summary.** Despite advances in spinal surgery, pseudarthrosis remains a pressing issue. In the framework of the task «Develop and implement the method of spinal fusion using autologous mesenchymal stem cells» (2017–2020), the following work was done: an bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) autotransplant was developed; the most appropriate dose of MSC for use in biotransplant has been established (the minimum dose of MSC for a graft should be at least 300.0×10^3 cells per cm^2); the effect of platelet rich plasma (PRP) on the proliferative activity of MSCs on the collagen sponge (addition of 5% PORFT leads to an increase in the synthesis of mRNA of the transcription factor, alkaline phosphatase and osteopontin 15.4, 1.4 and 13.2 times respectively); a method for obtaining an osteogenic biomedical cell product for biotransplant formation was developed; a program of clinical trials has been developed, on the basis of which one patient has been operated.

■ **Keywords:** spinal surgery, spinal fusion, pseudoarthrosis, autologous mesenchymal stem cells, biotransplant, spondylolisthesis.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-11-79-84>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Болтрукевич С. И. Наш опыт хирургического лечения пациентов с нестабильными травматическими повреждениями грудно-поясничного отдела позвоночника с использованием внутренней транспедикулярной фиксации и деминерализованного костного матрикса / С. И. Болтрукевич, С. Л. Чешик, В. И. Тупицын // Материалы VIII съезда травматологов-ортопедов Республики Беларусь. – Минск, 2008. С. 240–242.
2. Skorb E. V. Surface Nanoarchitecture for Bio-Applications: Self-Regulating Intelligent Interfaces / E. V. Skorb, D. V. Andreeva // Advanced Functional Materials. 2013. DOI: 10.1002/adfm.201203884.28.
3. Photocatalytic deposition of hydroxyapatite onto titanium dioxide nanotubular layer with fine tuning of layer nanoarchitecture / S. A. Ulasevich [et al.] // Langmuir. 2016. Vol. 32.P. 4016–4021.
4. Ripamonti U. Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primate / U. Ripamonti // Plastic. Reconstr. Surg. 2001. Vol. 107. P. 977–988.
5. Плазма крови, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов. Получение, стандартизация, медицинское применение / Поталнев М. П. [и др.] // Здравоохранение. 2018. №10. С. 38–44.
6. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток для клеточной терапии пациентов с боковым амиотрофическим склерозом в Республике Беларусь / Ю. Н. Рушкевич [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2015. №2. С. 130–136.

Статья поступила в редакцию 24.05.2019 г.

SEE http://innosfera.by/2019/11/spinal_surgery