

Ефективність застосування культивованих хондроцитів у відновленні кістково-хрящових дефектів колінного суглоба (експериментальне дослідження)

Зубов Д.О.¹, Поляченко Ю.В.², Коструб О.О.², Котюк В.В.² ✉, Блонський Р.І.², Засаднюк І.А.²

Резюме. Метою нашого дослідження було визначення ефективності застосування культивованих суглобових хондроцитів (ХЦ) у агарозному гідрогелі (ранні терміни спостереження, 3 міс.) у відновленні змодельованих кістково-хрящових дефектів критичного розміру колінного суглоба у великих тварин. **Матеріали і методи.** До експериментальної серії входили 4 собаки (права задня кінцівка), у яких створювали дефект суглобового хряща глибше субхондральної кістки в зоні міжжвиросткової борозни стегнової кістки діаметром 3 мм та 5 мм вглибину і яким другим етапом у травмований суглоб інтраартикулярно проводили імплантацію (пломбування) агарозного гелю з культивованими ХЦ. До контрольної серії входили 4 собаки (ліва задня кінцівка), яким у дефект зони міжжвиросткової борозни стегнової кістки не імплантували гель із клітинами. Агарозний гідрогель із культивованими аlogenними ХЦ товщиною 5 мм та діаметром 3 мм імплантували по типу аплікації в дефекти суглобових поверхонь після кюретажу дна і стінок кістково-хрящових дефектів суглобових поверхонь. Клітинні препарати і культури мікроскопувалися при 40-, 100-, 200- та 320-разовому збільшенні. Гістологічні зрізи товщиною 10-15 мкм, зроблені на кріотомі, зафарбовували гематоксилін-еозином та гематоксилін-нікрофуксином за ван Гізоном. **Результати.** Оптимізовано методику ферментативної ізоляції ХЦ суглобового хряща собаки. Показана задовільна ефективність застосування культивованих аlogenних суглобових ХЦ в агарозному гідрогелі (ранні терміни спостереження) в лікуванні змодельованих кістково-хрящових дефектів критичного розміру у великих тварин у межах запланованих термінів спостереження. **Висновки.** У проведенному експериментальному дослідженні визначена ефективність застосування культивованих аlogenних суглобових хондроцитів в агарозному гідрогелі (ранні терміни спостереження) у відновленні змодельованих кістково-хрящових дефектів критичного розміру колінного суглоба у собак в межах запланованих термінів спостереження. Через 3 міс. у групі експериментальних тварин виявлені ознаки утворення регенерату, який характеризувався незрілістю, наявністю суміші фіброзної сполучної тканини та фіброзного хрящу з осередками хондроїду.

Ключові слова: регенеративна медицина; культивовані хондроцити; клітинна терапія; дефекти суглобового хряща.

Вступ

Актуальні питання клітинної терапії дефектів суглобового хряща. Сучасний прогрес в області тканинної інженерії хряща дав можливість мультисциплінарного штурму проблемних аспектів моделювання та трансплантації штучного хряща з остаточним творчим рішенням в його результаті. Можливими альтернативами обмеженій кількості аутологічних клітин можуть стати мікроінкапсуляційна техніка чи модифікація ксеногенних або аlogenних клітин. Зрозуміло, генетично модифіковані клітини можуть вирощуватися на біосумісних підкладках із наявністю внутрішнього сигналу для програмованого гістогенезу. Успіхи в розробці матеріалів можуть породити "розумні" підкладки/носії (smart scaffolds), які будуть у змозі контролювати

✉ Котюк В.В., kotyuk_v@ukr.net

Зубов Д.О., zoubov77@yaboo.com

Поляченко Ю.В., poliach.yv@gmail.com

Коструб О.О., akostrub@ukr.net

Блонський Р.І., drblonskiy@ukr.net

Засаднюк І.А., zasadnyuk@ukr.net

¹ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України", м. Київ

²ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України", м. Київ

топологію тканини і мати поверхневі модифікації, будуть здатні стимулювати клітинну адгезію, диференціювання та ріст. Суглобовий хрящ є відносно простою тканиною через його клітинну гомогенність і аваскулярну природу. Складні штучні тканини або органи, такі як штучний суглоб, є метою на майбутнє. Міждисциплінарні взаємодії, ймовірно, прискорять прогрес і опосередкують застосування успішних розробок в області тканинної інженерії хряща для всього спектра клінічних потреб.

Першою клітинною технологією, спрямованою на відновлення пошкоджень суглобового хряща, став метод аутологічної трансплантації хондроцитів (АТХ), що був розроблений у 1994 р. М. Brittberg [1]. Спочатку ця техніка була імплантацією суспензії культивованих аутологічних хондроцитів (ХЦ) під періостальну латку. На сьогодні ця методика набула подальшого розвитку з генерацією біотехнологічних продуктів другого покоління, що представлені тривимірними конструкціями на основі клітин та компонентів матриксу. На теперішній час цією біотехнологічною послугою для лікування травматичних ушкоджень суглобового хряща скористалися понад 50 000 осіб по всьому світу, переважно з хорошими клінічними результатами [2]. Низка клітинних препаратів (клітинних сервісів) перебуває на різних етапах впровадження: від комерційних препаратів, схвалених FDA в США, до препаратів на різних стадіях клінічних випробувань [3].

Показання до цієї процедури ще не повністю уточнені. Вважається ідеальним, якщо пацієнт віком 15-55 років, має повношаровий локалізований дефект стегнового виростка, має непошкоджений меніск, не має генералізованої хондромалії, зміщення кінцівки, готовий і здатний пройти потужну реабілітацію (до 12 місяців). Ця процедура не рекомендується пацієнтам із нестабільним коліном, пацієнтам, чутливим до матеріалів телячого походження, або тим, що мають алергію на антибіотики. Процедура також не рекомендується дітям. Не пропонується вона і для використання на інших суглобах, окрім як на колінному.

На сьогодні повністю невдалий результат АТХ становить 10%. Два найбільш поширених ускладнень включають лізис трансплантата, а також формування фіброзу в ділянці дефекту й адгезії з поверненням больового синдрому та блокування суглоба. Решта потенційних ускладнень – це розвиток післяопераційної гематоми, гіпертрофічний синовіт і поверхнева ранова інфекція.

При використанні культивованих мультипотентних мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин (ММСК) із метою хрящової регенерації *in vivo* залишається невідомим той факт, чи потрібно їх попередньо диференціювати *in vitro* перед трансплантацією в хрящовий дефект або ж місцеве мі-

кроочення в ділянці трансплантації самостійно може індукувати хондрогенний фенотип некомітованих ММСК. Наприклад, хрящові дефекти стегнового виростка у собаки були успішно заміщені за допомогою колагенового гелю, засіяного некомітованими ММСК. Гістологічні дослідження двотижневого трансплантата виявили синтез фіброзного хряща, що містив хондроспецифічний колаген II типу. Відновлена тканина дефекту, що був заміщений трансплантатами, засіяними клітинами, хоча і показала задовільні біомеханічні властивості, проте утворений хрящ виявився за структурою більш близьким до нативного, ніж у не засіяних клітинами контрольних дефектах [4]. Порівняно нещодавно було показано, що аутологічні ММСК були успішно трансплантовані в хрящові дефекти у людини: 12 пацієнтів – кожен з ізольованим хрящовим дефектом медіального стегнового виростка – зазнали високої остеотомії великогомілкової кістки; ММСК забиралися з ділянки остеотомії, культивувалися і потім трансплантувалися в хрящовий дефект при повторному втручанні. У пацієнтів були досягнуті хороші клінічні результати впродовж 42 тижнів, і артроскопічні та гістологічні спостереження трансплантатів виявили створення більш функціонально активної хрящової тканини, ніж у контрольній групі без клітин [5]. J. Quantavalla et al. імплантували трансплантати, засіяні міченими флуоресцентною міткою ММСК, в остеохондральні дефекти з метою вивчити, чи можливо ідентифікувати трансплантовані клітини через 2 тижні в ділянках їхньої імплантації. Було з'ясовано, що більшість ММСК або мігрують у субхондральну кістку, або піддаються апоптозу [6].

Таким чином, основними актуальними питаннями, що виникають при розробці технологій культивування, експансії та трансплантації клітин із метою тканинної інженерії хряща і заміщення хрящових дефектів, є наступні.

1. Джерела клітин: які саме клітини є найбільш ефективними в аспекті хондрогенезу *in situ* і реституції хрящових дефектів тканиною, близькою до нативного хряща? Як такі клітини наразі використовують ХЦ (не тільки одержані з суглобового гіалінового, але й з еластичного хряща різної локалізації), а також ММСК кісткового мозку та жирової тканини? При виборі варіанта клітин для трансплантації в хрящовий дефект, безсумнівно, потрібно керуватися доступністю клітинного матеріалу в кожному клінічному випадку. Наприклад, якщо йдеться про оперативне втручання на колінному суглобі, то слід забрати паралельно із втручанням біоптат хрящової тканини з нешкодженої зони суглобової поверхні, що не піддається навантаженню, для одержання культури ХЦ. Вочевидь, оптимальними клітинами для заміщення хрящових дефектів

є культивовані ХЦ, одержані з самої хрящової тканини, які певний період субкультивування перебувають в анаболічному стані до настання феномену дедиференціювання ХЦ у культурі та які в нормі швидше реалізують *in vivo* свої гістогенетичні потенції до хондрогенезу.

2. Які клітини доцільно пересаджувати в хрящовий дефект? Некомітовані ММСК (із припущенням, що тканинне мікрооточення в ділянці трансплантації спрямує пересаджені клітини до хондрогенезу) або комітовані клітини, що отримали сигнал до диференціювання в ХЦ у культурі чи в процесі виготовлення носія, що містить, крім клітин, відомі фактори хондрогенезу.

3. Проблема інтеграції трансплантата з поверхнею дефекту хряща, тобто яким чином тривимірний носій із клітинами може бути інтегрований до ранового ложа по всій поверхні дефекту. Також необхідно визначитися, доцільніше пересаджувати носій із клітинами із заздалегідь змодельованою формою дефекту (виготовлення носія за шаблоном або формою дефекту безпосередньо в ході операції) або ж ефективнішою виявиться самоорганізація трансплантата безпосередньо в зоні дефекту при з'єднанні компонентів носія і клітин – це так звані хондроіндуктивні “smart scaffolds”.

Метою нашого дослідження було визначення ефективності застосування культивованих суглобових ХЦ в агарозному гідрогелі (ранні терміни спостереження, 3 міс.) у відновленні змодельованих кістково-хрящових дефектів критичного розміру колінного суглоба у великих тварин.

Матеріали і методи

Експерименти на тваринах виконувалися згідно з вимогами “*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes*” (Strasbourg, 18.03.1986, ratification date 01.01.1991, CETS №: 123) та згідно з підсумковим документом “*Захист тварин в дослідженнях*”, ухваленим на Першому національному конгресі з біоетики (Україна, Київ, 17-20 вересня 2001 р.).

Ізоляція та культивування первинних хондроцитів із гіалінового хряща собаки. Ізоляцію ХЦ із суглобового хряща собаки ($n=4$, $M_m=3,0$ г) проводили за загальноприйнятими методиками [7]. Тобто для ферментативного дезагрегування тканинного біоптату використовували 0,2% розчин колагенази ІА (Sigma, США). Отримані клітинні суспензії висівали в культуральні флакони (Corning, США) площею 25 см² зі щільністю посіву 4×10^4 /см².

Культивування ХЦ проводили в суміші поживного середовища DMEM/F12, 1:1, (Sigma-Aldrich,

США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ L-глутаміну (Sigma-Aldrich, США) та по 100 МО/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (Sigma-Aldrich, США), в CO₂-інкубаторі (Jouan, Франція) при 37 °C і 5% атмосфері CO₂ та насичувальній вологості. Зміна середовища проводилася кожну 3-4-ту добу культивування.

КУО-аналіз (колонієутворювальні одиниці). Процес колонієутворення досліджуваного типу клітин вивчали шляхом посіву 100 клітин на чашку Петрі (Ø100 мм, Costar, США) в ростовому середовищі, що містило DMEM/F12, 1:1, (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну (Sigma, США) та 100 МО/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (Sigma, США). Культивували в CO₂-інкубаторі (Jouan, Франція) при 37 °C і 5% атмосфері CO₂ та насичувальній вологості протягом 14 діб [7, 8]. Надалі колонії фарбували кристалічним фіолетовим та підраховували ефективність посіву (*PE, plate efficiency, %*), яку визначали за D. Proctor [7].

Кінетика росту клітинних популяцій культивованих хондроцитів. Число клітинних подвоень у популяції (n) та час подвоєння клітинної популяції (t) за умов, що остання перебуває в фазі логарифмічного росту в межах стандартної кривої росту клітинної популяції, визначали за загальноприйнятими формулами за Р. Фрешні [8].

Виготовлення агарозного гідрогелю з культивованими хондроцитами. Для приготування 2% агарозного гідрогелю з первинними культивованими хондроцитами в аlogenному варіанті використовували агарозу з показниками міцності для 1% гелю ≥ 1200 г/см² та точкою гелеутворення $36 \pm 1,5$ °C (Sigma, США) та поживне середовище DMEM-HG (з 4,5 г/л глюкози, РАА, Німеччина). Полімеризований агарозний гідрогель виготовляли в ямках 24-ямкової плашки (Corning, США) з концентрацією 10^7 клітин/мл/лунку. Ізоляцію хондроцитів із гелю проводили 0,02% розчином ЕДТА (хелатувальна речовина) та перевіряли на життєздатність методом фарбування 0,4% розчином трипанового синього.

Моделювання остеохондральних дефектів у собак. Експериментальне дослідження базується на результатах дослідження 4 безпородних собак із середньої початковою масою 15,3 кг, яким під кетаміновим наркозом виконувалося хірургічне втручання на суглобовому хрящі колінного суглоба (артротомія). До експериментальної серії входили 4 собаки (*права задня кінцівка*), у яких створювали дефект суглобового хряща глибше субхондральної кістки в зоні міжвиросткової борозни стегнової кістки діаметром 3 мм та 5 мм вглибину і яким другим етапом у травмований суглоб інтраартикулярно проводили імплантацію (пломбування) агарозного гелю з культивованими ХЦ (рис. 1).

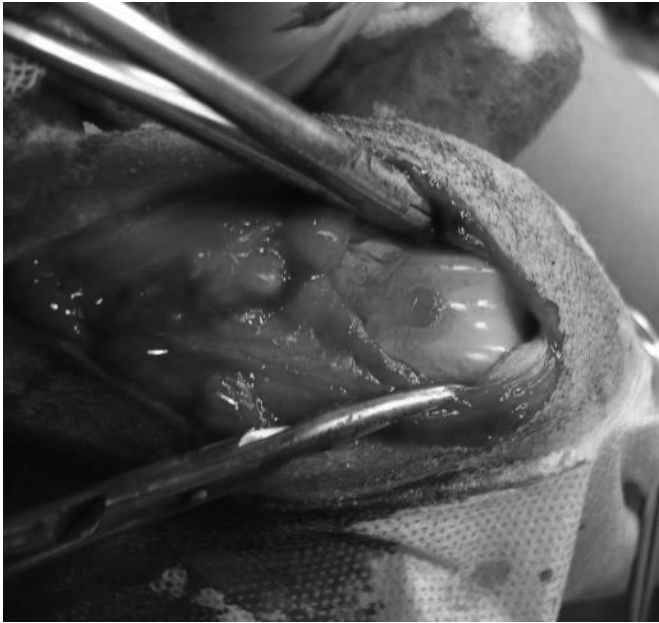


Рис. 1. Моделювання остеохондральних дефектів у собак: нанесення дефекту глибше субхондральної кістки та його заповнення агарозним гідрогелем із культивованими хондроцитами в експериментальній серії тварин

До контрольної серії входили 4 тварини (ліва задня кінцівка), яким у дефект зони міжвиросткової борозни стегнової кістки не імплантували гель із клітинами.

Агарозний гідрогель із культивованими алогенними ХЦ товщиною 5 мм та діаметром 3 мм (рис. 2г) імплантували за типом аплікації в дефекти суглобових поверхонь після кюретажу дна і стінок кістково-хрящових дефектів суглобових поверхонь. Суглобову капсулу герметично зашивали. У контрольній групі спостережень кістково-хрящовий дефект суглобових поверхонь залишали без наступної імплантації гелю з клітинами. Після операції тварин утримували в звичайних умовах виварію.

Тварин виводили з експерименту в 3-місячний термін, відраховуючи час від дня імплантації гідрогелю з клітинами, потім виокремлювали кінцівки, на яких були виконані хірургічні втручання і деякі – інтактні. Об'єктами гістологічного дослідження були суглобові кінці стегнової кістки, вирізані у фронтальній площині, частина дистального кінця стегнової кістки, вирізана в сагітальній площині.

Візуалізація клітин та культур із використанням методів мікроскопії. Візуалізацію (методами інвертованої мікроскопії в світлі, що проходить, і фазово-контрастної мікроскопії) і фотодокументування культур клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40C (Zeiss, Німеччина), морфометричної програми з обробки зображення AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss, Німеччина) і камери PowerShot G10 (Canon, США). Клітинні препарати і

культури піддавалися мікроскопії при 40-, 100-, 200- та 320-разовому збільшенні.

Морфологічні методи досліджень. Отримані фрагменти тканин колінних суглобів фіксували у 10% розчині забуферованого формаліну (рН=7,6) протягом 24 годин, розрізали по шматках із максимальним збереженням топографії, декальцинували в 5% розчині азотної кислоти і заливали в целоїдин. Гістологічні зрізи товщиною 10-15 мкм, зроблені на кріотомі, зафарбовували гематоксилін-еозином та гематоксилін-пікрофуксином за ван Гізоном.

Методи статистичної обробки результатів. Кількісні характеристики випадкових величин представлені у вигляді середніх значень та стандартних помилок середніх значень. Значущість розбіжностей показників оцінювалася за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Ізоляція та культивування хондроцитів гіалінового хряща собаки. Апробовано та оптимізовано методику ізоляції клітин – ХЦ із суглобового хряща собаки за допомогою ферментативного методу. У середньому з 3,0 г хряща виділялося $5,3 \times 10^6$ ХЦ. Первинно виділені клітини після адгезії до культурального флакона починали проліферувати з 2-ї доби. Морфологічно ХЦ у первинній культурі мали вигляд розшарованих округлих епітелоїдних клітин із повільною проліферацією, які формували клітинні кластери (рис. 2а). Неконфлюентні культури цього клітинного типу склалися з невеликої кількості клітинних кластерів-колоній, витягнутих у довжину, або трьох багатограних, що містили різну кількість клітин (до 30-50), деякі кластери зливалися. Таку притаманну культивованим ХЦ морфологію клітини зберігали протягом трьох пасажів (рис. 2б, в) та не змінювали на фібробластоїдну – ознака, характерна для хондроцитів у дедиференційованому стані.

КУО-аналіз. Формування колоній на чашках Петрі при низьких посівних концентраціях клітин (наприклад, 100 клітин/чашку Петрі), або іншими словами, визначення *ефективності посіву* (РЕ, %), є переважним методом аналізу проліферації клітин у культурі та їхньої виживаності. Такий підхід демонструє різницю в швидкості росту в межах популяції та виявляє різницю в зміні швидкості росту (розмір колонії) та виживаності клітин (число колоній). При посіві клітинної суспензії по чашках Петрі в низькій концентрації клітини зростають як дискретні колонії. Число цих колоній може бути використаним для відображення ефективності культивування обраного типу клітин [10]. Нами було досліджено колонієутворювальний потенціал ХЦ на 3-му пасажі методом КУО-аналізу згідно з протоколом D. Proctor для стромальних клітин [7]:

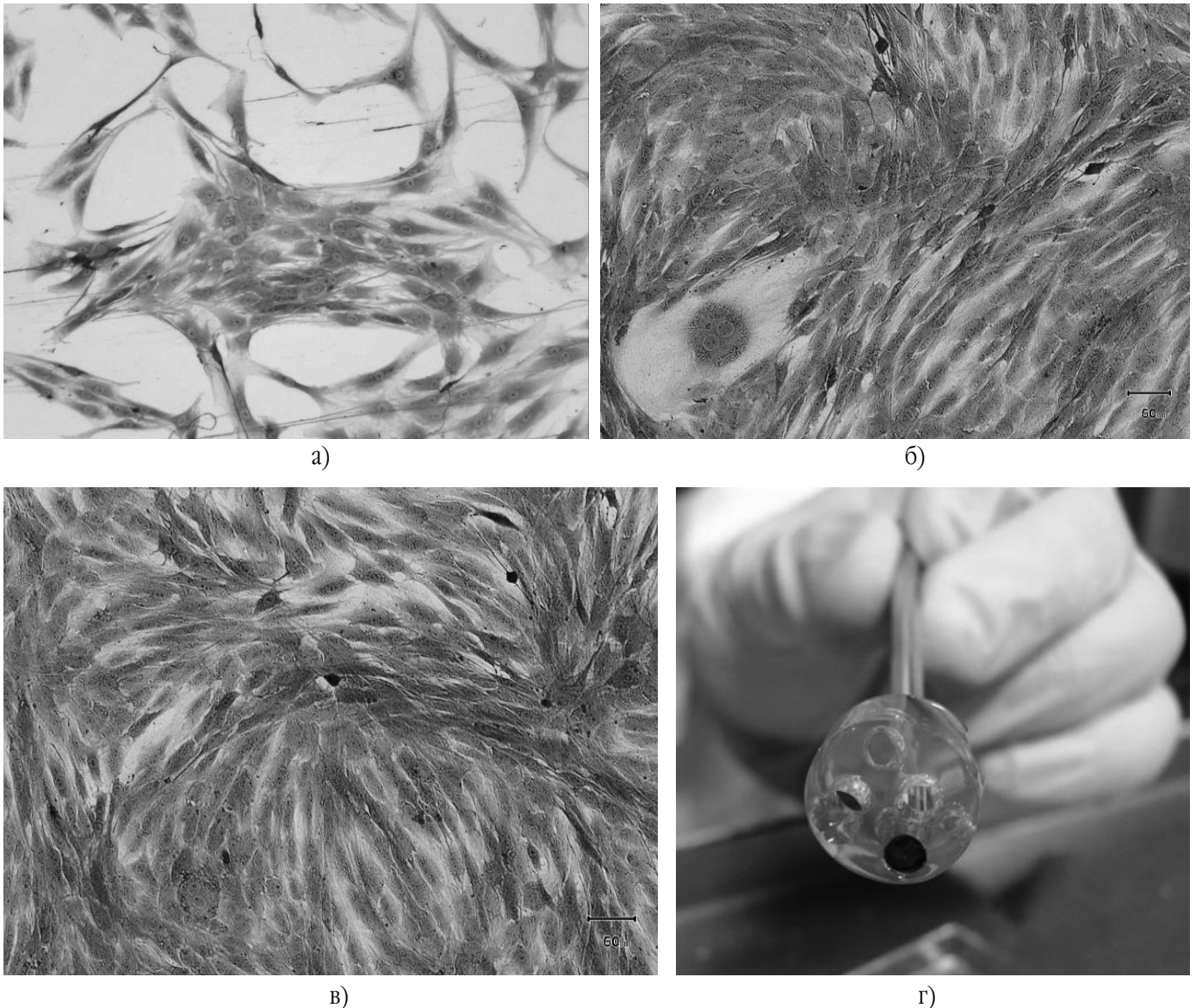


Рис. 2. Культура хондроцитів суглобового хряща собаки; фарб. кристалічним фіолетовим; ФКМ; лінійка – 50 мкм: а) первинна неконфлюентна культура; б) конфлюентна культура, перший пасаж; в) конфлюентна культура, третій пасаж; г) 3D-носії із клітинами: агарозний гідрогель із культивованими хондроцитами (10^7 клітин/мл/лунку)

так, на 100 клітин у середньому за 14 діб утворювалося $44,2 \pm 4,5$ колонії, $n=5$, а ефективність посіву хондроцитів склала близько $PE=44\%$.

Кінетика росту культивованих хондроцитів. Найважливішими параметрами оцінки ефективності нарощування клітин *in vitro* є такі параметри кінетики росту, як *число клітинних подвоєнь* у популяції та *час подвоєння клітинної популяції* за умов, що остання перебуває в фазі логарифмічного росту в межах стандартної кривої росту клітинної популяції. Під терміном *“ріст клітин”* мається на увазі збільшення числа клітин [8]. Число клітинних подвоєнь, або кількість випадків реплікації (n , або PDN, population doubling number), у популяціях ХЦ протягом трьох пасажів складало в середньому $PDN=4,4$. Час подвоєння клітинної популяції ХЦ, це час, про-

тягом якого відбувається подвоєння чисельності або маси популяції (t , PDT, population doubling time), склав у середньому $PDT=35$ годин.

Вплив імплантованих у носії хондроцитів на перебіг хондрорепаративних процесів при моделюванні критичних кістково-хрящових дефектів. Гістологічно в суглобових кінцях кісток, що утворюють колінний суглоб, виявлялись більше або менше виражені патологічні зміни у вигляді деформації суглобових кінців, різноманітних із різним ступенем вираженості патологічних змін суглобових поверхонь, що топографічно відображають складне поєднання дистрофічних, некротичних, запальних та репаративно-замісних змін. Ці зміни досягали найбільшого ступеня в суглобових поверхнях міжвиросткової борозни стегнової кістки, які зазнали безпосередньої травми. Патологічні змі-

ни в суглобових кінцях відмічали в місці ушкодження, тобто на місці та поблизу дефекту. Нозологічно ці зміни можуть бути узагальнені терміном “прогресуючий гонартроз, що розвинувся внаслідок гострого механічно-травматичного ушкодження суглобової поверхні стегнової кістки”, I-III стадії.

Патоморфологічні зміни в тканинах суглобових кінців при утворенні дефекту без аплікації агарозного гідрогелю з культивованими хондроцитами. Через 90 дб після утворення дефектів на суглобових поверхнях міжвиросткової борозни стегнової кістки спостерігались зміни, що відповідали гістологічній картині гонартрозу різної стадії. Суглобовий хрящ нерівномірно стоншений, відмічається виражена дистрофія хрящового матриксу, розволокнення поверхневої зони хряща; поверхня суглобового хряща помірно деформована, з боку міжвиросткової борозни на поверхні суглобового хряща розташовується тонкий шар фіброзного панусу (рис. 3). Подібні дистрофічно-деструктивні зміни суглобового хряща спостерігаються поряд із пателлярною поверхнею дистального кінця стегна.

Тобто в остеохондральному дефекті тварин контрольної групи спостерігалася повна деструкція гіалінового суглобового хряща на всю товщину, майже до патологічно зміненої субхондральної кісткової пластинки, з наявністю чи відсутністю заміщення цих дефектів фіброзною (найбільш часто), грануляційною тканиною, або ж волокнистим хрящем, або їх неоднорідним поєднанням. Оскільки деструкція, заміщення і проліферація ХЦ зазвичай слабо виражені і відбува-

ються нерівномірно, вони не забезпечують будь-якого значного заміщення зруйнованого суглобового хряща, гістологічна картина характеризується вираженим поліморфізмом та значними ділянками повного порушення гістоархітекτονіки суглобової поверхні. В одному зі спостережень у порожнині попереднього дефекту суглобової поверхні розміщувалася фіброзно-жирова васкуляризована тканина з невеликими осередками кісткової тканини (рис. 3в).

Патоморфологічні зміни в тканинах суглобових кінців при створенні дефекту за умов аплікації агарозного гідрогелю з культивованими хондроцитами. Попередньо створені дефекти суглобових поверхонь з імплантацією гелю з клітинами мають заповнений вигляд без заглиблень, їх поверхня вкрита тонким шаром фіброзної тканини. У дефектах спостерігається утворення хрящового регенерату (хондроїду) з наявністю більш-менш поширеної деструкції суглобового хряща в межах поверхневої та проміжних зон (рис. 4). При цьому регулярно зустрічаються гіперцелюлярні кластери хондроцитів як у ділянці дефекту, так і по його краях, що характерно для процесу неповноцінної репарації суглобового хряща (рис. 4а-в). В одному випадку гіаліновий хрящ нормальної структури був відсутній і заміщений сплюснутою фіброзною тканиною неоднорідної будови та волокнистим хрящем з осередками хондроїду, субхондральна кісткова пластинка деформована; наявна деструкція суглобового хряща з дистрофічними звапненнями, що проявляється зміщенням лінії звапнення глибокої зони суглобового хряща в бік суглобової поверхні.

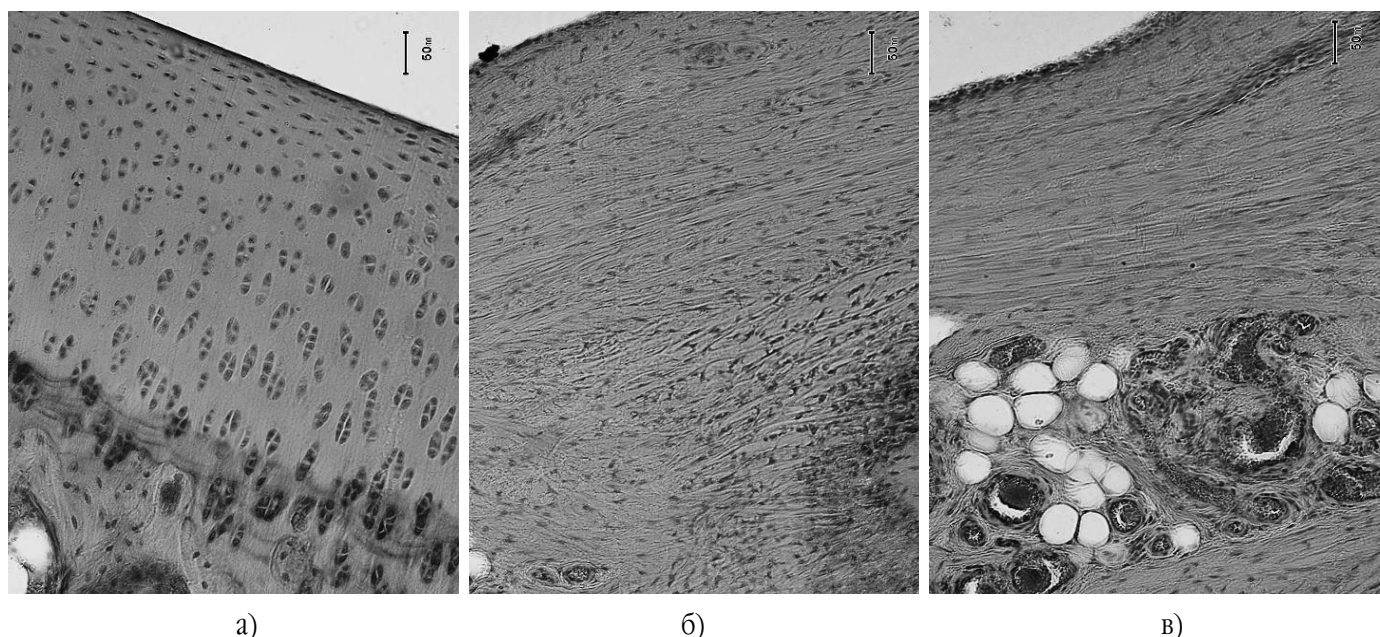
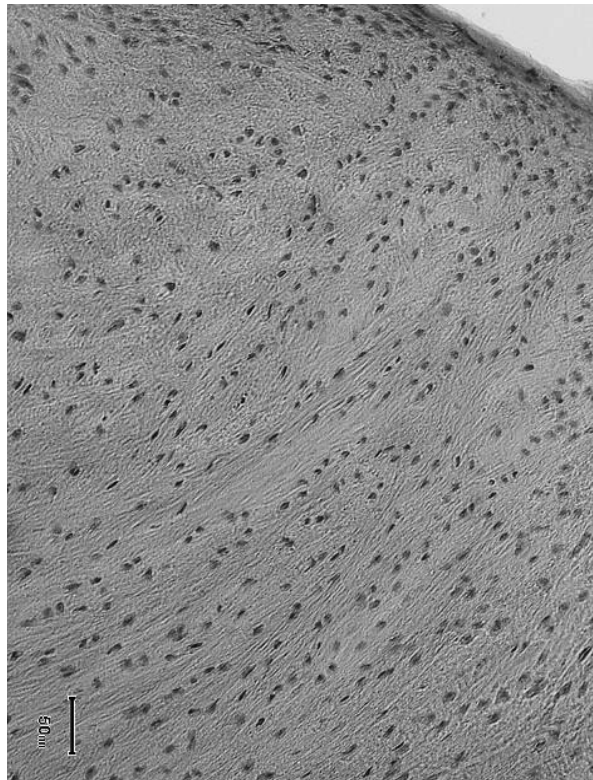
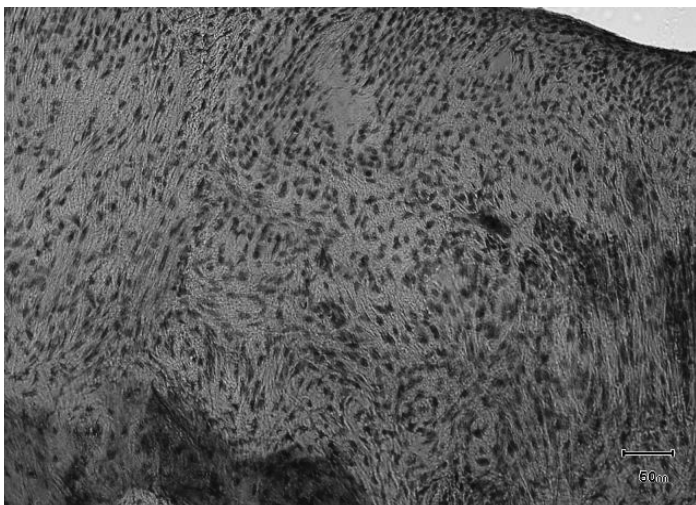


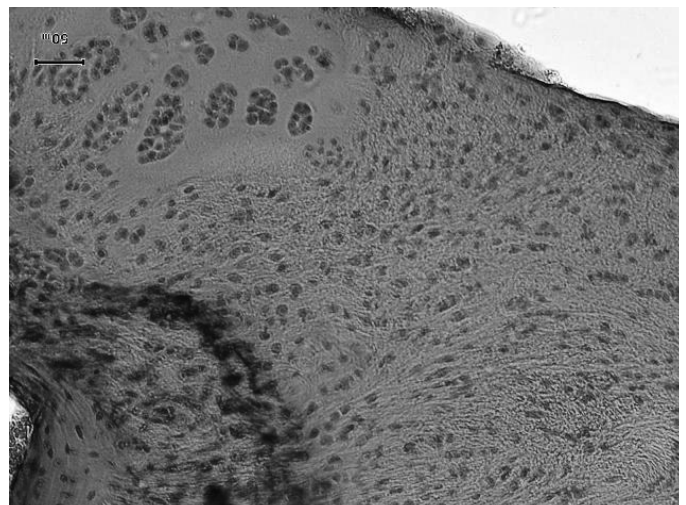
Рис. 3. Фіброзний та фіброзно-жировий регенерат, що утворився на 90-ту добу після нанесення остеохондрального дефекту міжвиросткової борозни у тварин *контрольної групи* (фарб. гематоксилін-еозином; ФКМ; лінійка – 50 мкм): а) гістологічна структура гіалінового хряща в нормі; б) заміщення дефекту фіброзною тканиною; в) заміщення дефекту фіброзно-жировою васкуляризованою тканиною



а)



б)



в)

Рис. 4. Хрящовий регенерат, що утворився на 90-ту добу після нанесення остеохондрального дефекту міжвиросткової борозни, заповненого агарозним гідрогелем із культивованими хондроцитами, у тварин експериментальної групи (ФКМ; лінійка – 50 мкм): а) утворення хрящового регенерату (хондроїду) в процесі неповної репарації суглобового хряща; фарб. гематоксилін-еозином; б) випадок заміщення дефекту сплюсненою фіброзною тканиною неоднорідної будови і волокнистим хрящем з осередками хондроїду; фарб. за ван Гізоном; в) те саме, але з наявністю зліва зверху гіперцелюлярних кластерів (проліфератів) хондроцитів; фарб. за ван Гізоном

Таким чином, патогістологічне дослідження тканин колінних суглобів собак, у яких відтворювали критичні кістково-хрящові дефекти суглобових поверхонь міжвиросткової борозни, показало, що в межах ранніх термінів спостереження (3 міс.) відновлення суглобових поверхонь у контрольній групі не виникало ні у

виді регенерації суглобового хряща як гіалінового, ні у вигляді репарації, тобто відновлення товщини суглобового хряща і заміщення дефекту. До того ж в окремих випадках не відновлювався дефект субхондральної кісткової пластинки – на цьому місці зберігався неправильної форми дефект кісткової пластинки

ки. За 3 міс. розвивалися патологічні зміни, що відображали неповноцінну репарацію компонентів суглобової поверхні і відповідали дистрофічно-деструктивному ураженню (гонартрозу) різної стадії.

Імплантація культивованих аlogenних ХЦ в агарозному гелі (10^7 клітин/мл гелю) в умовах цього експерименту не призвела до значної оптимізації репарації суглобової поверхні в ранній термін спостереження (3 міс.): поверхня регенерату зі сторони синовіальної оболонки була вкрита тонким шаром сполучнотканинного панусу, в ділянці дефекту спостерігалось формування хрящового регенерату (хондродної тканини) з наявністю більш-менш поширеної деструкції суглобового хряща в межах поверхневої та проміжних зон, які містили осередки хондродної тканини, що є характерним для ранніх стадій репарації суглобового хряща (до 3 міс.). Однак дефект хрящу був повністю заповнений, носій не спостерігався, однак можна чітко визначити наявність латеральної інтеграції між регенератом та прилеглими тканинами донора з гіперцелюлярними кластерами в крайових зонах. До того ж, за даними рекомендацій ICRS (*International Cartilage Repair Society*) Recommendation Papers [9], для цього терміну спостереження (3 міс.) у великих тварин, до яких належать і собаки, характерними ознаками утвореного регенерату є його незрілість, наявність суміші фіброзної сполучної тканини та фіброзного хрящу з осередками хондроду, що ми й спостерігали у нашому випадку. Взагалі біопсія в ранні терміни (перша доба – третій місяць) є корисною для вивчення процесів утримання імплантату з клітинами в ділянці дефекту, механізмів імплантації та взаємодійних факторів, що сприяють процесам відновлення пошкодженого хрящу. Гіаліноподібний хрящ з'являється у великих тварин у ділянці імплантації носія з клітинами значно пізніше – в терміни від 6 до 12 міс. [9].

Висновки

1. Оптимізовано методику ферментативної ізоляції ХЦ суглобового хряща собаки; ефективність посіву ХЦ виявлена в ході КУО-аналізу і дорівнювала PE=44%; при вивченні показників кінетики росту клітинних популяцій ХЦ було виявлено, що число клітинних подвоєнь складало в середньому PDN=4,4, а час подвоєння клітинної популяції клітин складав у середньому PDT=35,3 год.

2. Патогістологічне дослідження тканин колінних суглобів собак, у яких відтворювали критичні кістково-хрящові дефекти суглобових поверхонь міжвиросткової борозни, показало, що в межах термінів спостереження (3 міс.) відновлення суглобових поверхонь у контрольній серії без застосування агарозного гідрогелю з культивованими ХЦ не виникало, а патоморфологічна картина ділянки репарації відповідала

дистрофічно-деструктивному ураженню різної стадії (гонартрозу).

3. Патогістологічне дослідження тканин колінних суглобів собак, у яких відтворювали критичні кістково-хрящові дефекти суглобових поверхонь міжвиросткової борозни, показало, що в межах термінів спостереження (3 міс.) відновлення суглобових поверхонь в експериментальній серії із застосуванням аlogenних культивованих ХЦ в агарозному гелі призводило до ранніх стадій субституції ушкодженого хряща хондродною тканиною з наявністю більш-менш поширеної деструкції суглобового хряща, а поверхня регенерату зі сторони синовіальної оболонки була вкрита тонким шаром сполучнотканинного панусу, що є характерним для ранніх стадій репарації суглобового хряща (до 3 міс.).

4. Патогістологічне дослідження тканин колінних суглобів собак, у яких відтворювали критичні кістково-хрящові дефекти суглобових поверхонь міжвиросткової борозни, показало, що в межах термінів спостереження (3 міс.) хрящовий дефект був повністю заповнений, носій не спостерігався та чітко визначалась латеральна інтеграція між регенератом та прилеглими тканинами донора з гіперцелюлярними кластерами в крайових зонах. Характерними ознаками утвореного регенерату є його незрілість, наявність суміші фіброзної сполучної тканини та фіброзного хрящу з осередками хондроду.

5. Показана задовільна ефективність застосування культивованих аlogenних суглобових ХЦ в агарозному гідрогелі (ранні терміни спостереження) в лікуванні змодельованих кістково-хрящових дефектів критичного розміру у великих тварин у межах запланованих термінів спостереження.

Конфлікт інтересів. Ця публікація не викликає будь-якого конфлікту між авторами, не була і не буде предметом комерційної зацікавленості чи винагороди в жодній формі.

References

1. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994;331(14):889-895. DOI: 10.1056/NEJM199410063311401.
2. Brittberg M, Gersoff W. *Cartilage surgery: an operative manual.* Elsevier Saunders; 2011. 320 p.
3. Деев РВ. Анализ рынка клеточных препаратов для коррекции патологии скелетных тканей. *Клет. транспл. и ткан. инженер.* 2006;2(4):78-83. Deev RV. Market analysis of cell preparations for the correction of skeletal tissue pathology. *Klet. transpl. i tkan. inzhener.* 2006;2(4):78-83. [in Russian].
4. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1994;76(4):579-592. DOI: 10.2106/00004623-199404000-00013.

5. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(3):199-206. DOI: 10.1053/joca.2001.0504.
6. Quantavalla J, Uzeil-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, et al. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects *Biomaterials*. 2002;23(1):109-19. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00086-2.
7. Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA. *Mesenchymal stem cells: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. 192 p.
8. Фрешни Я. Культура животных клеток: практическое руководство. Пер. 5-го англ. изд. М: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2010. 691 с. Freshni Ya. *Animal cell culture: a practical guide*. Per. 5-go angl. izd. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2010. 691 s. [in Russian].
9. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, et al. Preclinical studies for cartilage repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society (*ICRS Recommendation Papers*). *Cartilage*. 2011;2(2):137-152. DOI: 10.1177/2F1947603511401905.

Effectiveness of Cultured Chondrocytes in the Restoration of Bone and Cartilage Defects of the Knee Joint (Experimental Study)

Zubov D.O.¹, Poliachenko Yu.V.², Kostrub O.O.², Kotiuk V.V.², Blonskyi R.I.², Zasadniuk I.A.²

¹SI "Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine", Kyiv

²SI "Institute of Traumatology and Orthopedics of NAMS of Ukraine", Kyiv

Summary. The aim of our study was to determine the effectiveness of cultured articular chondrocytes in agarose hydrogel (early follow-up, 3 months) in the restoration of simulated cartilaginous defects of the knee of critical size in large animals. **Materials and Methods.** The experimental series consisted of 4 dogs (right hind limb) with created defects of articular cartilage deeper than the subchondral bone in the area of the intercondylar notch of the femur with a diameter of 3 mm and 5 mm deep. At the second stage of the experiment, agarose hydrogel with cultured allogeneic chondrocytes was implanted (sealed) into the injured joint intraarticularly. The control series consisted of 4 animals (left hind limb) without agarose hydrogel with cultured allogeneic chondrocytes implantation to the intercondylar notch of the femur. Agarose hydrogel with cultured allogeneic chondrocytes was implanted by application into the defects of the articular surfaces after curettage of the bottom and walls of bone and cartilage defects of the articular surfaces. Cell preparations and cultures were microscopically magnified at 40, 100, 200, and 320 times. Histological sections 10-15 μm thick, made using a cryotome, were stained with hematoxylin-eosin and hematoxylin-picrofuxin according to van Gizon. **Results.** The technique of enzymatic isolation of chondrocytes articular cartilage of a dog was optimized. The satisfactory efficacy of cultured allogeneic articular chondrocytes in agarose hydrogel (early observation) in the treatment of simulated bone and cartilage defects of critical size in large animals within the planned observation period is shown. **Conclusions.** The experimental study explored the effectiveness of the use of cultured allogeneic articular chondrocytes embedded in agarose hydrogel (early follow-up period) in the restoration of modeled knee cartilage defects of critical size in dogs within the planned follow-up period. For the selected follow-up period (3 months), the signs of regenerate formation, which was characterized by its immaturity and the presence of a mixture of fibrous connective tissue and fibrous cartilage with the chondroid structure inclusions, were revealed in experimental group.

Key words: regenerative medicine; cultured chondrocytes; cell therapy; articular cartilage defects.

Эффективность применения культивируемых хондроцитов в возобновлении костно-хрящевых дефектов коленного сустава (экспериментальное исследование)

Зубов Д.А.¹, Поляченко Ю.В.², Коструб А.А.², Котюк В.В.², Блонский Р.И.², Засаднюк И.А.²

¹ГУ "Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины" г. Киев

²ГУ "Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины", г. Киев

Резюме. Целью нашего исследования было определение эффективности применения культивируемых суставных хондроцитов (ХЦ) в агарозном гидрогеле (ранние сроки наблюдения, 3 мес.) в возобновлении смоделированных костно-хрящевых

дефектов критического размера коленного сустава у крупных животных. **Материалы и методы.** В экспериментальную серию входили 4 собаки (правая задняя конечность), у которых создавали дефект суставного хряща глубже субхондральной кости в зоне межмышечковой борозды бедренной кости диаметром 3 мм и 5 мм вглубь и которым вторым этапом в травмированный сустав интраартикулярно проводили имплантацию (пломбирование) агарозного геля с культивируемыми ХЦ. В контрольную серию входили 4 собаки (левая задняя конечность), которым в дефект зоны межмышечковой борозды бедренной кости не имплантировали гель с клетками. Агарозный гидрогель с культивируемыми аллогенными ХЦ толщиной 5 мм и диаметром 3 мм имплантировали по типу аппликации в дефекты суставных поверхностей после кюретажа дна и стенок костно-хрящевых дефектов суставных поверхностей. Клеточные препараты и культуры микроскопировались при 40-, 100-, 200- и 320-кратном увеличении. Гистологические срезы толщиной 10-15 мкм, сделанные на криотоме, окрашивали гематоксилин-эозином и гематоксилин-пикрофуксином по ван Гизону. **Результаты.** Оптимизирована методика ферментативной изоляции ХЦ суставного хряща собаки. Показана удовлетворительная эффективность применения культивированных аллогенных суставных ХЦ в агарозном гидрогеле (ранние сроки наблюдения) в лечении смоделированных костно-хрящевых дефектов критического размера у крупных животных в пределах запланированных сроков наблюдения. **Выводы.** В проведенном экспериментальном исследовании определена эффективность применения культивированных аллогенных суставных хондроцитов в агарозном гидрогеле (ранние сроки наблюдения) в возобновлении смоделированных костно-хрящевых дефектов критического размера коленного сустава у собак в пределах запланированных сроков наблюдения. Через 3 мес. в группе экспериментальных животных выявлены признаки образования регенерата, который характеризовался незрелостью, наличием смеси фиброзной соединительной ткани и фиброзного хряща с ячейками хондроиды.

Ключевые слова: регенеративная медицина; культивируемые хондроциты; клеточная терапия; дефекты суставного хряща.