

Биомедицинский клеточный материал для регенерации суставного хряща: биосовместимые и гистоморфологические свойства (экспериментальная модель подкожной имплантации)

**В. И. Севастьянов, Г. А. Духина, А. С. Пономарева, Л. А. Кирсанова,
Н. В. Перова, Н. Н. Скалецкий**

Исследование в условиях *in vivo* биологической безопасности биомедицинского клеточного продукта для регенерации суставного хряща при подкожной имплантации клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани. Сравнительное исследование биологической безопасности клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани человека (КИК ХТч) и биосовместимого биополимерного микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса (БМКГ-матрикса) в имплантационном тесте не выявило достоверных различий между контрольной и опытной группами животных. Полученный результат свидетельствует о том, что клеточная компонента КИК ХТч не является фактором риска при ее имплантации на сроке до 28 суток. Выявлены некоторые признаки формирования хрящевой ткани в месте подкожной имплантации исследуемой КИК ХТч. Учитывая доказанную ранее высокую пролиферативную и дифференцировочную активность КИК ХТч при ее культивировании в течение 42 суток, можно предположить перспективность использования КИК ХТч для регенерации поврежденного суставного хряща в качестве инъекционной формы биомедицинского клеточного продукта.

Ключевые слова: микроструктурированный гидрогель, коллагенсодержащий матрикс, МСК жировой ткани человека, хондрогенная дифференцировка, клеточно-инженерная конструкция, суставной хрящ, подкожная имплантация, биосовместимость.

Введение

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 [1]. В основе заболевания лежит изнашивание, истончение и гибель суставного хряща с выпадением его амортизационной функции. В более позднем периоде возможно присоединение дегенеративно-дистрофических изменений в субхондральной костной ткани близ сустава. Нередко болезнь приводит к значительному ухудшению качества жизни, устойчивой утрате трудоспособности и инвалидности пациента, осо-

бенно, если поражены тазобедренные и коленные суставы. Это связано с ограничением подвижности и резкой болью при движении или нагрузке.

Заболеваемость остеоартрозом в России занимает лидирующее место среди болезней суставов и наблюдается практически во всех возрастных группах [1]. 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 ОА. 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 ОА. Отсутствие в суставном хряще кровоснабжения, а также 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 [2].

Метод лечения хряща, основанный на трансплантации аутологичных хондроцитов, получил наибольшее клиническое применение [3]. Однако этот метод не лишен недостатков, основные из которых травматичность биопсии здорового участка хряща, возможность дедифференцировки хондроцитов в условиях *in vitro*, включая фибробластоподобную перестройку [4] и не полное восстановление хрящевой ткани. В связи с этим в качестве альтернативы данному методу были рассмотрены варианты замены хондроцитов на мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые присутствуют во всех органах и тканях человеческого организма и обладают мультилинейным потенциалом дифференцировки в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях [5].

Одним из перспективных подходов является стимулирование восстановительных процессов поврежденного суставного хряща путем введения *in situ* биомедицинского клеточного продукта в виде КИК ХТ, включающей в себя следующие компоненты [6]:

— мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из эндогенных источников у пациента (аутологичные клетки) или от доноров (аллогенные клетки) и способные формировать функционирующий внеклеточный матрикс (ВКМ);

— подходящий биосовместимый биодegradуемый носитель (матрикс, каркас) для трансплантации клеток и временного биоискусственного матрикса;

— биоактивные молекулы (цитокины, факторы роста), которые оказывают биостимулирующее действие на клетки поврежденной ткани.

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 МСК, обладают способностью к мультилинейной дифференцировке в мезенхимальные линии [7, 8].

В последнее время для получения тканевого эквивалента хрящевой ткани разрабатывают тканеинженерные конструкции с применением различных трехмерных полимерных матриксов [9, 10].

Ранее нами были проведены сравнительные исследования регенеративного потенциала МСК жировой ткани человека (МСК ЖТч) с различной степенью хондрогенной дифференцировки (монослой, 3D-культура (микросферы) и недифференцированные МСК) при культивировании на БКМГ-матриксе [14]. В качестве матрикса для КИК ХТ была выбрана инъекционная форма биополимерного микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогеля (БКМГ) из линейного ряда композиции гетерогенного имплантируемого геля *Сферо*®ГЕЛЬ (ЗАО “БИОМИР сервис”, г. Краснознаменск, Россия), зарегистрированного на территории РФ. Имплантируемый материал *Сферо*®ГЕЛЬ производится из экстрактов эмбриональных и постнатальных тканей животного происхождения [11] и представляет собой уникальный комплекс практически всех высоко- и низкомолекулярных компонентов внеклеточного матрикса, что обуславливает его высокие биосовместимые и биостимулирующие свойства. Инъекционная форма *Сферо*®ГЕЛЬ чрезвычайно удобна для разработки малоинвазивных технологий в замещающей и регенеративной хирургии [12, 13].

Было показано, что наибольший пролиферативный и дифференцировочный потенциал МСК ЖТч в условиях *in vitro* наблюдается при их хондрогенной дифференцировке непосредственно в процессе культивирования в БКМГ-матриксе. На основании полученных результатов был выбран оптимальный состав биомедицинского клеточного продукта КИК ХТ: МСК ЖТч на 2–3 пассаже, посеянных в хондрогенной среде на БКМГ-матриксе при концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл гидрогеля. Через 42 суток культивирования КИК ХТ выбранного состава в стандартных условиях наблюдали существенное увеличение клеточной массы, прорастание клеток в глубину БКМГ и увеличение количества ВКМ, вырабатываемое клетками. Гистохимический и иммуногистохимический анализы выявил значительное количество коллагена II типа, свойственного хрящевой ткани, а также активный синтез гликозаминогликанов (ГАГ). В некоторых препаратах были обнаружены лакунообразные области — группы из нескольких клеток, окруженные ВКМ, напоминающие изогенные группы клеток нативного хряща. Заметим, что мы не смогли получить жизнеспособные клеточно-инженерные конструкции хрящевой ткани, используя в качестве клеточного компонента преддифференцированные в хондрогенном направлении МСК ЖТч в монослой или в 3D-культуре методом “микросфер” [14, 15]. Полученные результаты совпали с данными других исследователей. В работе [16] показано, что

МСК ЖТч, культивируемые в монослое, неспособны синтезировать ГАГ даже в присутствии индукционной хондрогенной среды. В [17] обнаружено, что МСК, культивированные в коллагеновом гидрогеле, продуцируют большее количество ГАГ, чем при культивировании клеток в виде трехмерных агрегатов высокой плотности. Так же непосредственная дифференцировка МСК в гидрогеле позволяет получить лакуноподобные области, характерные для хрящевой ткани в отличие от культивирования клеток методом микросфер.

Несмотря на доказанные высокие биосовместимые свойства БМКГ (*Сферо*®ГЕЛЯ) — матричного компонента клеточно-инженерной конструкции для регенерации суставного хряща, доклинические исследования биомедицинского клеточного материала КИК ХТч требуют обязательной оценки его биологической безопасности.

Цель данной работы — исследование в условиях *in vivo* биологической безопасности биомедицинского клеточного материала для регенерации суставного хряща при подкожной имплантации клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани экспериментальным животным (мышы-самцы линии DBA).

Материалы и методы

Получение и культивирование МСК ЖТч

МСК получали из образцов подкожно-жировой клетчатки человека по стандартной методике, описанной ранее [7]. 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 МСК 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 и 70 мкм, ресуспендировали в РС и высевали в культуральные флаконы (Corning-Costar, США). Культивирование осуществляли в стандартных условиях: при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO₂. Замену РС проводили каждые 3 суток. Визуально культуру оценивали с помощью инвертированного микроскопа (Micros MC700, Австрия). В экспериментах использовали МСК ЖТч 2 – 3 пассажей.

БМКГ-матрикс

В качестве БМКГ-матрикса, как и в предыдущих исследованиях *in vitro* [10] была взята инъекционная форма БМКГ из линейного ряда *Сферо*®ГЕЛЬ биополимерный микроструктурированный гидрогель — композиция гетерогенного имплантируемого геля (торговый знак *Сферо*®ГЕЛЬ, ФСР 2012/13033 от 01.02.2012 г., производитель ЗАО “БИОМИР сервис”, г. Краснознаменск, Россия). Используемая в качестве матрикса инъекционная форма БМКГ из линейного ряда *Сферо*®ГЕЛЬ имела следующие характеристические свойства: средний размер микрочастиц — 145,79 ± 0,09 мкм; модуль упругости — 1170 ± 12 Па; модуль вязкости — 62,9 ± 7,9 Па; набухаемость — не ниже 86,6 ± 3,0 масс.%; время биорезорбции БМКГ — до 9 месяцев.

Образцы КИК ХТч для введения лабораторным животным

Для получения КИК хрящевой ткани человека МСК ЖТч снимали с культурального пластика методом трипсинизации и послойно смешивали в 15 мл стерильных центрифужных пробирках (Corning-Costar, США) с прогревом до 37 °С в течение 30 мин БМКГ-матриком при концентрации гидрогеля 2·10⁶ кл./мл. Через 2 ч в пробирки добавляли индукционную хондрогенную среду (STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (Invitrogen, USA)). Далее КИК ХТ инкубировали в индукционной хондрогенной среде в течение 7 суток при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1 % CO₂. Перед имплантацией КИК ХТ аккуратно промывали раствором Хэнкса (Панэко, Россия) для удаления дифференцировочной среды.

Подкожная имплантация КИК ХТ лабораторным животным

Все манипуляции с животными (мышы-самцы линии DBA) проводили согласно принципам гуманного отношения к животным в соответствии с Международными рекомендациями, а также с соблюдением биоэтических норм и требований Международного комитета по науке.

Животные и их содержание

Мышы-самцы линии DBA получены из питомника лабораторных животных Филиала “Андреевка” ФГБУ “Научного центра биомедицинских технологий” РАМН, дата получения — 3 октября 2012 г.,

ветеринарное свидетельство № 0329456. Мышей содержали в стандартных условиях, в клетках из поликарбоната. Температуру и влажность помещения регистрировали и документировали раз в день. Аклиматизация животных в виварии лаборатории проходила в течение 14 суток. Во время этого периода все животные оставались здоровыми.

Условия проведения эксперимента

КИК ХТ имплантировали мышам-самцам линии DBA подкожно в область средней линии спины. Длительность эксперимента составила 28 суток.

Формирование групп и манипуляции с животными

Животных распределяли по группам рандомизировано. В качестве критерия принимали массу тела, таким образом, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего более чем на 10%. Были сформированы следующие группы: контрольная группа (численностью $n = 7$) — имплантировали БМКГ, опытная группа ($n = 10$) — КИК ХТч.

За сутки до начала проведения исследования иммунокомпетентных мышей обеих групп депрессировали иммуностатическим препаратом Сандиммун (содержание активного вещества Циклоспорина 50 мг/мл) в дозе 5 мг/кг и лишали корма.

Имплантацию выполняли под общей анестезией, которую обеспечивали с помощью внутримышечных инъекций ветеринарного препарата Золетил (регистрационный номер ПВИ-2-1.9/01425, Франция) дозировкой 15 мг/кг.

Хирургическую процедуру проводили в стерильных условиях. Волосы на коже в области операции удаляли бритвой. Этот участок обрабатывали антисептическим раствором (70% раствора спирта). КИК ХТ и биополимерный гетерогенный гидрогель без клеток имплантировали в область средней линии спины. Разрезали кожу и тупым рассечением делали карман. Основание кармана располагали на расстоянии более 10 мм от линии разреза. В карман помещали по одному имплантату или по 0,5 мл БМКГ. После хирургической процедуры рану рашивали рассасывающимся шовным материалом MONOCRYL*Plus (Johnson & Johnson, США).

В течение исследования ежедневно проводили наблюдение за каждым животным, при этом отмечая:

— состояние ран (сроки заживления, наличие инфекции, гематом, некротических тканей, тип заживления, миграцию имплантата);

— общий вид (шерстный покров, глаза, уши, конечности, зубы); состояние и поведение (активность, походка, темперамент, питание);

— физиологические функции (дыхание, слюноотделение, мочеиспускание, экскрет);

На протяжении эксперимента 1 раз в неделю фиксировали массу тела.

Исследование биологического материала

Животных из эксперимента выводили в 2 этапа: через 14 суток и через 28 суток после имплантации. Мышей подвергали эвтаназии с помощью избытка эфирного наркоза после 18 ч голодания.

Для клинического анализа кровь отбирали в специальные пробирки “Юнивет” (Эйлитон, Россия) с антикоагулянтом ЭДТА. Анализ проводили на гематологическом анализаторе “Medonic” (Bohle Medical A.B., Швеция) для ветеринарии. Для биохимических анализов крови использовали специальные пробирки с гранулами для отделения сыворотки. Биохимические анализы осуществляли унифицированными методами на биохимических фотометрах “Stat fax 1904+” и “Stat fax 4500+” (Awareness Technology, США) с использованием стандартных наборов реагентов UTS (Юнимед, Россия).

Исследовали показатели клинического анализа крови: концентрацию эритроцитов (RBC), гематокрит (HCT), концентрацию тромбоцитов (PLT), гемоглобина (HGB), лейкоцитов (WBC) с дифференцированием по 3 популяциям: лимфоциты (LYM), средние лейкоциты (MID), гранулоциты (GRAN).

Определяли показатели биохимического анализа крови: активность щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание глюкозы, триглицеридов, мочевины, общего белка, калия.

Вскрытие проводили сразу после гибели по полной патологоанатомической схеме. Животных подвергали некропии, включая: осмотр внешней поверхности тела, места введения, черепной, грудной, брюшной полостей и их содержимого.

Морфометрическую оценку параметров органов животных осуществляли с помощью весов “Vibra” (Shinko Denshi CO.Ltd, Япония) с последующим вычислением абсолютной (вес органов) и относительной массы (органо-соматический показатель) органов и их стандартных отклонений.

Для гистологических исследований забирали ткань в зоне имплантации БМКГ-матрикса и КИК ХТч и фиксировали в течение 4 ч в 10% растворе формалина.

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Статистическую

достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента (*p*). Достоверным считали различие данных групп при *p* < 0,05.

Гистологические и иммуногистохимические методы оценки

Методика приготовления парафиновых срезов

Образцы тканей, взятые в зоне имплантации БМКГ-матрикса и КИК ХТч, фиксированные в 10%-м растворе формалина, промывали в проточной воде и обезжировали в этаноле с восходящими концентрациями (70%, 80%, 90%, 96%, 100%), обезжиривали в смеси абсолютного этанола с хлороформом или ксилолом и заливали в парафин с добавлением пчелиного воска. Срезы толщиной 4 – 5 мкм получали с помощью микротомы Leica (модель RM 3255, Германия).

Окрашивание парафиновых срезов гематоксилином и эозином, альциановым синим и по методу Малло

Гистологические препараты депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим, по методу Маллори согласно стандартным методикам.

Окрашивание парафиновых срезов к коллагену II типа

Визуализацию окрашивания препаратов на коллаген человека II типа осуществляли с использованием Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System (RE7130-K, Leica Microsystems), следуя инструкции производителя. Перед окрашиванием депарафинизованные гистологические срезы подвергали ретривизации — инкубация в 0,1 % растворе трипсина при 37 °С в течение 30 мин. После инкубации с Novocastra™ Peroxidase Block, Novocastra™ Protein Block, оптимально разведенными первичными антителами к коллагену человека

II типа, вторичными антителами и Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP срезы каждый раз дважды промывали в течение 5 мин раствором 0,5 М трис-буфера, pH = 7,6 (Sigma, США). Затем срезы промывали дистиллированной водой, докрашивали Novocastra™ Hematoxylin (RE7107, Leica Microsystems), проводили по восходящим концентрациям этанола, инкубировали с ксилолом и заключали в канадский бальзам. Реакция с пероксидазой вызывала видимый коричневый осадок в области местоположения антигена.

Визуальную оценку гистологических препаратов проводили с помощью оптического микроскопа Olympus CX41 (Япония), при исходном увеличении ×200. Препараты фотографировали с помощью камеры Nikon CoolPix 990 (Япония).

Результаты и обсуждение

Морфологические изменения КИК ХТч условиях *in vivo* (экспериментальная модель подкожной имплантации)

Интегральные показатели

На протяжении эксперимента все животные оставались живы. Каких-либо отклонений в поведении (повышенной или пониженной активности) и состоянии мышечной опытной группы (имплантация КИК ХТч) по сравнению с контрольной группой (имплантация БМКГ-матрикса) не отмечено. Дыхание у мышечной опытной группы, как и у контрольных, было обычного ритма, незатрудненное; снахождение без патологии; частота, количество и цвет мочи, консистенция фекальных масс в пределах физиологической нормы. Масса тела мышечной на протяжении исследования значительно (*p* < 0,05) не отличалась между группами (табл. 1).

Оценка заживления ран

У всех мышечной (за исключением 1 животного в контрольной группе и 1 животного в опытной группе)

Таблица 1

Динамика изменения массы тела мышечной (*M ± m, г*)*

№ группы	Группа животных	Масса животных, <i>M ± m, г</i>				
		Фон	7 суток	14 суток	21 сутки	28 суток
1	Контроль (БМКГ-матрикс)	23,2 ± 0,4 (<i>n</i> = 10)	24,5 ± 0,8 (<i>n</i> = 9)	23,3 ± 0,9 (<i>n</i> = 9)	26,0 ± 2,0 (<i>n</i> = 5)	27,0 ± 1,5 (<i>n</i> = 5)
2	КИК ХТч	22,8 ± 0,3 (<i>n</i> = 10)	23,6 ± 0,6 (<i>n</i> = 9)	23,7 ± 0,4 (<i>n</i> = 9)	26,1 ± 1,0 (<i>n</i> = 5)	26,3 ± 0,6 (<i>n</i> = 5)

* — нет достоверных различий по *t*-критерию Стьюдента (*p* > 0,05) между показателями контрольной и опытной группы.

были гладкие жизнеспособные, плотно соприкасающиеся края ран, очаги некроза и микрофлоры отсутствовали, что говорит о заживлении ран первичным натяжением. Через 3 – 4 суток после имплантации наблюдали формирование соединительнотканного рубца и завершение процессов эпителизации. У двух мышей с ранее отмеченным плохим заживлением раны (по одной из каждой группы) в месте имплантации возникли воспаления, в ранах преобладали процессы альтерации тканей. Образование грануляционной ткани отмечено через 6 – 7 суток. В процессе воспаления имплантаты эмигрировали наружу. Данные животные были выведены из эксперимента.

Клинические и биохимические исследования крови

В табл. 2 приведены усредненные групповые результаты клинического анализа крови подопытных

животных. Имплантируемые материалы не повлияли на гемопоэз ни через 14, ни через 28 суток после имплантации. На 14 сутки исследования у мышей наблюдали значительное снижение количества лейкоцитов, что может быть объяснено предимплантационным иммуносупрессированием.

В табл. 3 приведены усредненные данные некоторых показателей биохимического анализа сыворотки крови. Никаких достоверных отличий в показателях ферментного, белкового, липидного и углеводного обмена в опытной группе животных по сравнению с контрольной группой не выявлено.

Патоморфологические данные

Макроскопическое исследование

По результатам макроскопического исследования изучаемых органов, забранных через 14 и

Таблица 2

Средние показатели клинического анализа крови ($M \pm m$)*

Форменные элементы крови	Сроки исследования, сутки	<i>n</i>	БМКГ-матрикс	КИК ХТч
Эритроциты, $10^{12}/л$	14	4	$6,10 \pm 0,17$	$5,90 \pm 0,93$
	28	5	$6,60 \pm 1,94$	$8,60 \pm 0,74$
Тромбоциты, $10^9/л$	14	4	$346,0 \pm 42,4$	$303,6 \pm 66,5$
	28	5	$407,5 \pm 6,1$	$417,2 \pm 5,2$
Гематокрит, %	14	4	$24,3 \pm 1,9$	$22,3 \pm 4,1$
	28	5	$33,1 \pm 6,1$	$37,7 \pm 3,5$
Гемоглобин, г/л	14	4	111 ± 17	$105,4 \pm 17,9$
	28	5	$160,3 \pm 1,5$	$145,6 \pm 7,2$
Лейкоциты (WBC), $10^9/л$	14	4	$4,80 \pm 0,16$	$4,70 \pm 0,56$
	28	5	$11,9 \pm 2,1$	$13,10 \pm 2,23$
Лимфоциты (LYM), %	14	4	$76,5 \pm 4,5$	$78,50 \pm 1,35$
	28	5	$71,6 \pm 7,5$	$68,80 \pm 1,20$
Моноциты (MID), %	14	4	$9,7 \pm 1,3$	$7,30 \pm 1,55$
	28	5	$12,60 \pm 2,85$	$13,10 \pm 1,28$
Гранулоциты (GRAN), %	14	4	$12,8 \pm 4,2$	$12,00 \pm 1,36$
	28	5	$15,90 \pm 4,65$	$18,10 \pm 0,46$

*— нет достоверных различий по *t*-критерию Стьюдента ($p > 0,05$) между показателями на 14 и 28 сутки эксперимента, а также между контрольной и опытной группы.

Таблица 3

Средние показатели биохимического анализа крови ($M \pm m$)*

Параметр	Сроки исследования, сутки	<i>n</i>	БМКГ-матрикс	КИК ХТЧ
Мочевина, ммоль/л	14	4	$4,00 \pm 0,95$	$4,80 \pm 0,09$
	28	5	$4,2 \pm 0,8$	$5,50 \pm 0,12$
ЩФ, Ед/л	14	4	$511,6 \pm 67,6$	$526,7 \pm 27,1$
	28	5	$593,2 \pm 149,2$	$467,0 \pm 58,8$
Общий белок, г/л	14	4	$56,5 \pm 1,1$	$54,4 \pm 1,9$
	28	5	$56,0 \pm 1,6$	$56,0 \pm 2,3$
Триглицериды, ммоль/л	14	4	$2,00 \pm 0,61$	$1,70 \pm 0,17$
	28	5	$2,10 \pm 0,46$	$2,1 \pm 0,3$
Глюкоза, ммоль/л	14	4	$7,70 \pm 0,18$	$7,00 \pm 0,91$
	28	5	$8,60 \pm 1,09$	$8,70 \pm 0,30$
Калий, ммоль/л	14	4	$8,8 \pm 1,4$	$10,90 \pm 0,47$
	28	5	$10,4 \pm 0,2$	$9,70 \pm 0,86$

*— нет достоверных различий по *t*-критерию Стьюдента ($p > 0,05$) между показателями на 14 и 28 сутки эксперимента, а также между контрольной и опытной группы.

Средние групповые показатели массы внутренних органов и ОСП*

Органы	Масса внутренних органов и ОСП за сроки исследования, сутки			
	14		28	
	БМКГ-матрикс (n = 4)	КИК ХТч (n = 4)	БМКГ-матрикс (n = 5)	КИК ХТч (n = 5)
Масса печени, г	1,47 ± 0,08	1,24 ± 0,05	1,72 ± 0,16	1,41 ± 0,06
ОСП, %	6,10 ± 0,35	5,39 ± 0,15	6,13 ± 0,26	5,35 ± 0,14
Масса почек, г	0,390 ± 0,031	0,370 ± 0,011	0,410 ± 0,045	0,400 ± 0,002
ОСП, %	1,63 ± 0,12	1,60 ± 0,04	1,500 ± 0,084	1,540 ± 0,035
Масса сердца, г	0,15 ± 0,01	0,130 ± 0,004	0,150 ± 0,015	0,140 ± 0,002
ОСП, %	0,63 ± 0,04	0,550 ± 0,007	0,540 ± 0,086	0,540 ± 0,010
Масса тимуса, г	0,030 ± 0,001	0,020 ± 0,003	0,040 ± 0,011	0,030 ± 0,001
ОСП, %	0,110 ± 0,004	0,090 ± 0,013	0,14 ± 0,031	0,130 ± 0,006
Масса селезенки, г	0,18 ± 0,01	0,160 ± 0,014	0,13 ± 0,040	0,110 ± 0,020
ОСП, %	0,75 ± 0,04	0,720 ± 0,060	0,490 ± 0,175	0,480 ± 0,074
Масса семенника, г	0,180 ± 0,000	0,150 ± 0,017	0,160 ± 0,020	0,170 ± 0,007
ОСП, %	0,750 ± 0,000	0,630 ± 0,064	0,600 ± 0,011	0,660 ± 0,036

*— нет достоверных различий по *t*-критерию Стьюдента ($p > 0,05$) между показателями на 14 и 28 сутки эксперимента, а также между контрольной и опытной группы.

28 суток после имплантации, различий между группами не было обнаружено.

У животных при вскрытии кожа чистая, подкожно-жировой слой развит умеренно. Расположение внутренних органов правильное. Свободной жидкости в плевральной и брюшной полости не обнаружено. Париетальный и висцеральный листки плевры и брюшины тонкие, блестящие, гладкие. Визуально исследовали подкожно-жировой слой, подчелюстные лимфатические узлы и слюнные железы, легкие, сердце, пищевод, желудок, печень, желчный пузырь, поджелудочную железу, селезенку, почки, надпочечники, мочевого пузыря, тимус, головной мозг. Состояние тканей и органов у всех животных было в пределах морфологической нормы.

Место имплантации без воспаления. Имплантаты покрыты тонкой прозрачной капсулой. Признаков отторжения не наблюдается.

Морфометрический анализ внутренних органов

Были изъяты и взвешены следующие органы: печень, почки (две), сердце, селезенка, тимус, семенники (два).

Достоверных отличий как абсолютной, так и относительной массы внутренних органов (ОСП) мышей опытной группы, от контрольной группы не выявлено ни на каком сроке (табл. 4).

Гистологическое исследование места имплантации

Через 14 суток после имплантации в гистологических препаратах образцов БМКГ-матрикса,

окрашенных гематоксилином и эозином, в подкожной клетчатке выявляли фрагменты эозинофильного биополимерного гетерогенного гидрогеля, окруженные гетерогенной клеточной популяцией, включающей эпителиоподобные клетки, полиморфноядерные лейкоциты, фибробластоподобные клетки, макрофаги, многоядерные гигантские клетки инородных тел, а так же многочисленные капилляры (рис. 1з). Наблюдала проникновение групп клеток и одиночных клеток в толщу гидрогелевого матрикса. В препаратах образцов КИК ХТч, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечена активная клеточная реакция на имплантат с участием многочисленных полиморфноядерных лейкоцитов, макрофагов, гигантских клеток инородных тел. При этом, полиморфноядерные лейкоциты — преобладающий клеточный тип. Наличие многочисленных капилляров вместе с гетерогенной клеточной популяцией свидетельствует о процессе формирования грануляционной ткани. Так же, как и в контрольных образцах (БМКГ-матрикс), наблюдали прорастание клеток в толщу БМКГ, сопровождающееся его частичной резорбцией (рис. 1а). Отеков обнаружено не было.

Окрашивание опытных срезов по методу Маллори выявило тонкие коллагеновые волокна синего цвета, окружающие фрагменты БМКГ-матрикса (рис. 1б). При окрашивании срезов альциановым синим, удалось обнаружить лишь единичные локусы, демонстрирующие позитивную реакцию на ГАГ (рис. 1в).

К сожалению, не удалось получить препараты контрольных образцов через 28 суток подкожной имплантации.

В препаратах опытных образцов, окрашенных гематоксилином и эозином, через 28 суток фрагмен-

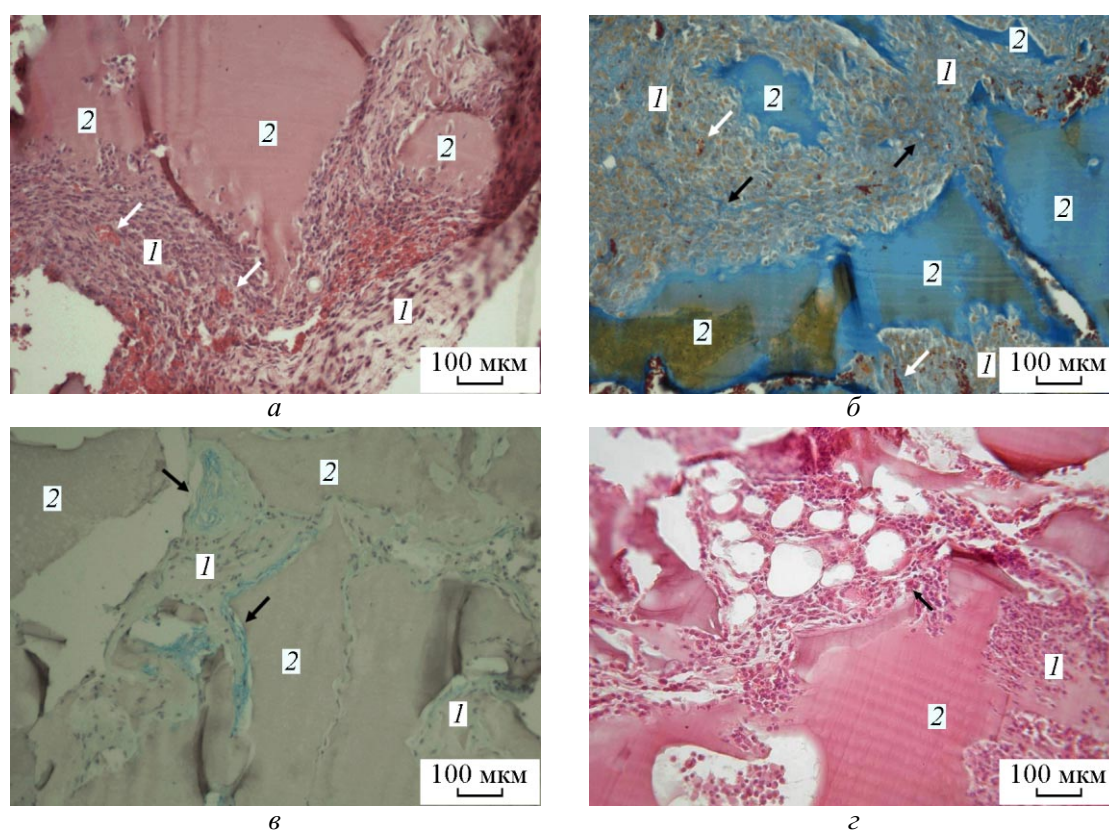


Рис. 1. 14 суток подкожной имплантации КИК ХТч, состоящей из БМКГ-матрикса и МСК ЖТч: *а* – окрашивание гематоксилином и эозином; *б* – окрашивание на коллаген по методу Маллори (указано черными стрелками); *в* – окрашивание альциановым синим на гликозаминогликаны (указано черными стрелками); *з* – контроль (БМКГ-матрикс), окрашивание гематоксилином и эозином. 1 – гетерогенная клеточная популяция, 2 – биополимерный гетерогенный гидрогель; *а, б* – капилляры указаны белыми стрелками; *з* – капилляры указаны черными стрелками.

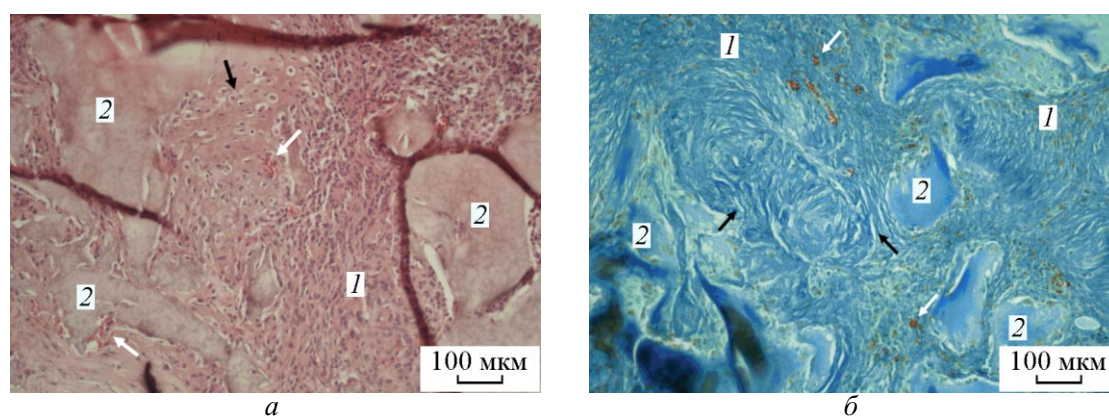


Рис. 2. 28 суток подкожной имплантации КИК ХТ, состоящей из биополимерного гетерогенного гидрогеля и МСК ЖТч: *а* – окрашивание гематоксилином и эозином (черными стрелками указаны лакунообразные структуры); *б* – окрашивание на коллаген по методу Маллори (указано черными стрелками). 1 – гетерогенная клеточная популяция, 2 – БМКГ-матрикс, капилляры указаны белыми стрелками.

ты БМКГ-матрикса окружены гетерогенной клеточной массой с явным преобладанием фибробластоподобных клеток, в некоторых участках формирующих соединительнотканную капсулу (продолжается

ангиогенез). Наблюдается более выраженная, по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, резорбция гетерогенного гидрогеля с замещением его рубцовой тканью с преобладанием внекле-

точного матрикса (рис. 2а). Выявлено прогрессивное увеличение массы коллагеновых волокон (рис. 2б). Локальное сине-зеленое окрашивание альциановым синим, специфическое для ГАГ, выражено нечетко и выявляется не во всех образцах. В отдельных участках имплантата встречаются немногочисленные лакунообразные структуры, характерные для хрящевой ткани (рис. 2а). Отсутствие токсичности и туморогенности в обеих группах животных, что говорит о биологической безопасности КИК ХТ.

В известных нам работах, посвященных исследованию морфологических изменений КИК ХТ на основе биополимерных гидрогелей и МСК из разных источников в условиях *in vivo*, были представлены противоречивые результаты. Так, одной группой исследователей получены доказательства формирования тканеинженерной конструкции хрящевой ткани, а именно, наличие ГАГ и новообразованного коллагена II типа при подкожной имплантации мышам линии nude преддифференцированных в монослое или в 3D-культуре МСК, помещенных в гидрогель на основе кремнийсодержащей гиросил-пропил метилцеллюлозы [16]. Напротив, другими авторами установлено снижение количества ГАГ и увеличение количества коллагена I типа через 28 суток подкожной имплантации дифференцированных МСК ЖТч в хондрогенном направлении в альгинатном гидрогеле [18]. Это может объясняться процессами дедифференцировки МСК и формированием фиброзной ткани в условиях *in vivo*. По-видимому, процесс формирования ТИК ХТч во многом зависит от свойств используемого матрикса.

Заключение

В экспериментальной модели подкожной имплантации мышам линии DAB на сроках до 28 суток доказана биологическая безопасность КИК ХТч, состоящей из биodeградируемого микрогетерогенного гидрогелевого матрикса и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, предварительно культивируемой в течение 7 суток в индукционной хондрогенной среде. Наблюдения за состоянием животных в течение эксперимента, клинические и биохимические исследования крови и патоморфологические данные с морфометрическим анализом внутренних органов не выявили достоверных различий между контрольной группой (имплантация БМКГ-матрикса) и опытной группой (имплантация КИК ХТч). Полученный результат свидетельствует о том, что клеточная компонента тканеинженерной конструкции ХТч не является фактором риска при имплантации КИК ХТч на сроке

имплантации до 28 суток. Более того, выявлены некоторые признаки формирования хрящевой ткани в месте подкожной имплантации исследуемой КИК ХТч.

Учитывая доказанную ранее высокую пролиферативную и дифференцировочную активность КИК ХТч при ее культивировании в течение 42 суток [14], можно предположить перспективность использования КИК ХТч для регенерации поврежденного суставного хряща в качестве инъекционной формы биомедицинского клеточного продукта.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках гранта №13-04-12017офи_м и частичной финансовой поддержке РНФ в рамках гранта №14-25-00055.

Литература

1. Ревматология. Национальное руководство. Под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010, 720 с.
2. Melero-Martin J.M., Al-Rubeai M. In vitro expansion of chondrocytes. Topics in Tissue Engineering, 2007, v. 3, p. 37.
3. Jones D.G., Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. In the book: Cartilage repair strategies. Ed. by Williams R.J. Humana Press, Totowa, New Jersey; 2007, p. 137 – 166.
4. Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., Vecsei V., Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. J. Bone Joint Surg., 2004, v. 86B(2), p. 286 – 295.
5. Danišovič L., Lesný P., Havlas V., Teyssler P., Syrová Z., Kopáni M., Fujeříková G., Trč T., Syková E., Jendelová P. Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Applied Biomedicine, 2007, v. 5, p. 139 – 150.
6. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Немец Е.А., Сургученко В.А., Пономарева А.С. Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине. В книге: Биосовместимые материалы (учебное пособие). Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011., Часть II, глава 3, с. 237 – 252.
7. Егорова В.А., Пономарева А.С., Богданова Н.Б., Абрамов В.Ю., Севастьянов В.И. Характеристика фенотипа МСК из жировой ткани человека методом проточной цитометрии. Технологии живых систем, 2009, v. 6, no. 5, p. 40 – 46.
8. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz P., Hedrik M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue engineering, 2001, v. 17, iss. 1, p. 211 – 228.
9. Liu J., Zhao B., Zhang Y., Lin Y., Hu P., Ye C. PHBV and predifferentiated human adipose-derived stem cells for

- cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Research.*, 2010, v. 94A, iss. 2, p. 603 – 610.
10. Сургученко В.А. Матрицы для тканевой инженерии и гибридных органов. В книге: Биосовместимые материалы. Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011, Часть II; глава 1, p. 199 – 228.
 11. Севастьянов В.И., Перова Н.В. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент РФ № 2433828, 2011.
 12. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Немец Е.А., Сургученко В.А., Пономарева А.С. Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине. В книге: Биосовместимые материалы. Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. Часть II, глава 3, с. 237 – 252.
 13. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Сайковский Р.С., Соловьева И.В. Применение инъекционных форм биополимерных гетерогенных гидрогелей при дегенеративно-дистрофических поражениях суставов. Практическое пособие для врачей. М.: Триада, 2012, 27 с.
 14. Сургученко В.А., Пономарева А.С., Кирсанова Л.А., Бубенцова Г.Н., Скалецкий Н.Н., Севастьянов В.И. Формирование тканеинженерной конструкции хрящевой ткани в условиях *in vitro*. Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2013, v. 15, no. 3, p. 66 – 72.
 15. Surguchenko V.A., Ponomareva A.S., Kirsanova L.A., Skaleckij N.N., Sevastianov V.I. 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.*, 2014, v. 102, no. 3. Article first published online: 22 APR 2014 | DOI: 10.1002/jbm.a.35197.
 16. Merceron C., Portron S., Masson M., Lesoeur J., Fella B., Gauthier O., Geffroy O., Weiss P., Guicheux J., Vinatier C. The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant.*, 2011, v. 20, iss. 10, p. 1575 – 1588.
 17. Chung C., Burdick J.A. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2008, v. 60, p. 243 – 262.
 18. Vinardell T., Sheehy E.J., Buckley C.T., Kelly D.J.A. Comparison of the functionality and *in vivo* phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Engineering*, 2012, v. 18 A, iss. 11 – 12, p. 1161 – 1170.
 3. Jones D.G., Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. In the book: Cartilage repair strategies. Ed. by Williams R.J. Humana Press, Totowa, New Jersey; 2007, pp. 137 – 166.
 4. Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., Vecsei V., Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J. Bone Joint Surg.*, 2004, vol. 86B, no. 2, pp. 286 – 295.
 5. Danišovič L., Lesný P., Havlas V., Teyssler P., Syrová Z., Kopáni M., Fujeříková G., Trč T., Syková E., Jendelová P. Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Applied Biomedicine*, 2007, vol. 5, pp. 139 – 150.
 6. Sevastianov V.I., Perova N.V., Nemets E.A., Surguchenko V.A., Ponomareva A.S. *Biosovmestimye materialy* [Biocompatible materials (textbook)]. Ed. by: Sevastianov V.I., Kirpichnikov M.P. Moscow, MIA Publ., 2011, 2(3), pp. 237 – 252.
 7. Egorova V.A., Ponomareva A.S., Bogdanova N.B., Abramov V.Yu., Sevastianov V.I. Characteristic phenotype MSC from the fatty tissue of humans by flow cytometry. *Technologies of living systems*, 2009, vol. 6, no. 5, pp. 40 – 46.
 8. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz P., Hedrik M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 2001, vol. 17, no. 1, pp. 211 – 228.
 9. Liu J., Zhao B., Zhang Y., Lin Y., Hu P., Ye C. PHBV and predifferentiated human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Research*, 2010, vol. 94A, no. 2, pp. 603 – 610.
 10. Surguchenko V.A. The matrices for tissue engineering and hybrid organs. In: *Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by Sevastianov V.I., Kirpichnikov M.P. Moscow, MIA Publ., 2011, chapter 2(1), pp. 199 – 228.
 11. Sevastianov V.I., Perova N.V. Injecting heterogeneous biopolymer hydrogel for replacement therapy and regenerative surgery and how to obtain it. Russian Federation patent no. 2433828, 2011.
 12. Sevastianov V.I., Perova N.V., Nemets E.A., Surguchenko V.A., Ponomareva A.S. In: *Biocompatible materials (textbook)*. Ed. by Sevastianov V.I., Kirpichnikov M.P. MIA Publ., Moscow, 2011; Chapter 2(3), pp. 237 – 252.
 13. Sevastianov V.I., Perova N.V., Sajkovskij R.S., Solov'eva I.V. The use of injectable biopolymer heterogeneous hydrogels with degenerative-dystrophic lesions of the joints. *Practical manual for doctors*. Moscow, Triada Publ., 2012, 27 p.
 14. Surguchenko V.A., Ponomareva A.S., Kirsanova L.A., Bubentsova G.N., Skaletskij N.N., Sevastianov V.I. On the possibility of *in vitro* formation of tissue-engineered construct of cartilage on the basis of cell-engineered construct composed of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov – Russian journal of transplantology and artificial organs*, 2013, vol. 15, no. 3, pp. 66 – 72.

References

1. Nasonov Ye.L., Nasonova VA. *Revmatologiya. Natsionalnoye rukovodstvo* [Rheumatology. National handbook]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2010, 720 p.
2. Melero-Martin J.M., Al-Rubeai M. *In vitro* expansion of chondrocytes. *Topics in Tissue Engineering*, 2007, vol. 3, 37 p.

15. Surguchenko V.A., Ponomareva A.S., Kirsanova L.A., Skaleckij N.N., Sevastianov V.I. 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*, 2014, vol. 102, no. 3. Article first published online: 22 APR 2014, DOI: 10.1002/jbm.a.35197.
16. Merceron C., Portron S., Masson M., Lesoeur J., Fellah B., Gauthier O., Geffroy O., Weiss P., Guicheux J., Vinatier C. The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant.*, 2011, vol. 20, no. 10, pp. 1575 – 1588.
17. Chung C., Burdick J.A. Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Review*, 2008, vol. 60, pp. 243 – 262.
18. Vinardell T., Sheehy E.J., Buckley C.T., Kelly D.J. A Comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Engineering*, 2012; vol. 18 A, no. 11 – 12, pp. 1161 – 1170.

Статья поступила в редакцию 12.08.2014 г.

Севастьянов Виктор Иванович — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова” Минздрава России, заведующий отделом, профессор, доктор биологических наук, специалист в области биоматериаловедения, тканевой инженерии и регенеративной медицины, систем доставки лекарственных веществ. E-mail: viksev@yandex.ru.

Духина Галина Анатольевна — АНО “Институт медико-биологических исследований и технологий”, руководитель группы, специалист в области экспериментальных моделей для исследования биологической безопасности и функциональной активности медицинских изделий и фармпрепаратов. E-mail: duhinagalina@mail.ru

Пonomарева Анна Сергеевна — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова” Минздрава России, научный сотрудник, кандидат биологических наук, специалист в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

Кирсанова Людмила Анфилофьевна — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова” Минздрава России, старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, специалист в области гистохимических методов и тканевой инженерии.

Перова Надежда Викторовна — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова” Минздрава России, ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, специалист в области доклинических исследований медицинских изделий и фармпрепаратов, тканевой инженерии и регенеративной медицины. E-mail: 89266076625@mail.ru.

Скалецкий Николай Николаевич — ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова” Минздрава России, заведующий лабораторией, доктор медицинских наук, специалист в области клеточных технологий и тканевой инженерии. E-mail: nskaletsky@mail.ru.

A biomedical cell product for the regeneration of articular cartilage: Biocompatible and histomorphological properties (An experimental model of subcutaneous implantation)

**V. I. Sevastianov, G. A. Dukhina, A. S. Ponomareva, L. A. Kirsanova,
N. V. Perova, N. N. Skaletskiy**

In vivo study of the biological safety of a biomedical cell product for the regeneration of articular cartilage with the subcutaneous implantation of the cell-engineered cartilage tissue is carried out. A comparative study of the biological safety of CEC ATH and the biocompatible BMCH-matrix in the implantation test did not show significant differences between the control and the experiment groups. The results show that the cell component of the cell-engineered construct of ATH is not a risk factor for the implantation of CEC ATH for up to 28 days. During the study, some signs of formation of articular tissue have been observed at the site of subcutaneous implantation of CEC ATH. Considering the previously confirmed high proliferation and differentiation activity of CEC ATH after its cultivation for 42 days, it is possible to presume the potential of using CEC ATH for the regeneration of the injured cartilage as an injection form of a biomedical cell product.

Key words: microstructured gel, collagen-content matrix, human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells, chondrogenic differentiation, tissue-engineered construct, articular cartilage, subcutaneous implantation, biocompatibility

Sevastianov Viktor — Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, professor; Dr.Sci.(Biolog), head of department, e-mail: viksev@yandex.ru.

Dukhina Galina — Institute of biomedical research and technology, team leader, e-mail: duhinagalina@mail.ru

Ponomareva Anna — Academician V.I.Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, PhD, research worker; e-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

Kirsanova Lyudmila — Academician V.I.Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, PhD, senior research worker.

Perova Nadezhda — Academician V.I.Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Dr.Sci.(Biolog), leading research worker, e-mail: 89266076625@mail.ru.

Skaletskiy Nikolay — Academician V.I.Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Dr.Sci (Med), head of laboratory, e-mail: nskaletsky@mail.ru.