

## АУТОТРАНСПЛАНТАЦИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ПОЯСНИЧНОМ СПОНДИЛОДЕЗЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Михаил Владимирович Хейфец\*

Научно-исследовательский институт клинической иммунологии, г. Новосибирск,  
Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, г. Новосибирск,  
354-й окружной военный клинический госпиталь

### Реферат

**Цель.** Оценка способности аутологичных иммобилизованных стромальных клеток костного мозга обеспечить эффективную репарацию с формированием полноценного костного блока в зоне межтелового дефекта двигательного сегмента позвоночника после тотального удаления межпозвонкового диска.

**Методы.** Изучены эффекты аутотрансплантации выделенных из костного мозга различных клеточных фракций (моноклеарных, стромальных клеток и стромальных стволовых клеток) на формирование переднего костного блока при межтеловом спондилодезе в эксперименте на 24 беспородных разнополых собаках (средняя масса тела 18,3 кг, средний диаметр тел поясничных позвонков по данным рентгенографии 18,6 мм). Всем животным выполнена пункция гребня крыла правой подвздошной кости с аспирацией 10 мл костного мозга, проведена тотальная дискэктомия на уровне тел VII и VIII поясничных позвонков с замещением межтелового дефекта пористым металлическим цилиндром из никелида титана соответствующих формы и размера. Все животные случайным образом были разделены на четыре группы, по 6 в каждой. В первой группе межтеловой дефект заполняли только пористым металлическим цилиндром, во второй группе – фракцией моноклеарных клеток костного мозга, в третьей – фракцией стромальных клеток, в четвертой – фракцией выращенных в культуре стромальных клеток.

**Результаты.** В первой (контрольной) группе выявлены признаки замедленного формирования переднего костного блока, образование гипертрофического межтелового псевдоартроза. Отмечено формирование грубой фиброзной капсулы в зоне контакта «имплантат-кость», избыток хрящевой ткани, малочисленность и низкая пролиферативная активность остеобластов, гипоплазия сосудов.

Во второй группе определялся формирующийся артифициальный костный блок с паравerteбральным гиперостозом, рентгенологически – микродислокация имплантата с протрузией в тело смежного позвонка и частичная остеоинтеграция с пористой структурой фиксатора в зоне контакта «имплантат-кость». Образование костной ткани происходило по типу вторичного остеогенеза с избытком хрящевой ткани.

В третьей и четвертой группах формировался полноценный артифициальный костный блок, признаков дислокации имплантата не отмечено. Определялась полная остеоинтеграция с пористой структурой фиксатора в зоне контакта «имплантат-кость». Новообразованная костная ткань муфтообразно окружала имплантат и врастала в его пористую структуру, прорастала в периостальную зону тел смежных позвонков, прочно спаиваясь с их поверхностью.

**Вывод.** Предложенный способ коррекции расстройств остеорепаляции можно рассматривать в качестве альтернативы костнопластическим операциям с пересадкой массивных костных трансплантатов, а также в условиях системных расстройств остеопозитической функции с критическим дефицитом эндогенных предшественников костных клеток.

**Ключевые слова:** стромальные клетки костного мозга, репаративный остеогенез, спондилодез.

### AUTOTRANSPLANTATION OF IMMOBILIZED STROMAL BONE MARROW CELLS DURING LUMBAR SPONDYLOSYNDESIS IN AN EXPERIMENT M.V. Kheifets. Scientific Research Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia, Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Novosibirsk, Russia, 354th District Military Clinical Hospital, Russia. Aim. To assess the ability of immobilized autologous bone marrow stromal cells to provide an effective repair with the formation of a robust bone block in the area of the interbody defect of the spinal motor segment after total removal of the intervertebral disc. Methods. Studied were the effects of autotransplantation of different cell fractions isolated from the bone marrow (mononuclear, stromal cells and stromal stem cells) on the formation of the anterior bone block during interbody spondylosynesis in an experiment on 24 mongrel dogs of different sexes (mean weight 18.3 kg, the mean diameter of the lumbar vertebral bodies according to radiographic study 18.6 mm). All animals underwent the crest puncture the right wing of the ilium, with aspiration of 10 ml of bone marrow, conducted was a total diskectomy at the level of the bodies of the VII and VIII lumbar vertebrae with replacement of the interbody defect with a porous metal cylinder of the Nickel titanium of an appropriate shape and size. All animals were randomly divided into four groups, 6 in each. In the first group the interbody defect was filled with a porous metal cylinder only, in the second group – with the fraction of bone marrow mononuclear cells, in the third – with the fraction of stromal cells, in the fourth – with the fraction of culture-grown stromal cells. Results. In the first (control) group established were the signs of delayed formation of the anterior bone block, formation of the hypertrophic interbody pseudarthrosis. Noted was the formation of coarse fibrous capsule in the zone of «implant-bone» contact, an excess of cartilage tissue, the small size and low proliferative activity of osteoblasts, hypoplasia of the blood vessels. In the second group determined was the forming artificial bone block with paravertebral hyperostosis, radiologically – microdislocation of the implant with protrusion into the body of the adjacent vertebra and

partial osteointegration with the porous structure of the fixer in the contact «implant-bone» zone. Bone formation occurred by the type of secondary osteogenesis with an excess of cartilage tissue. In the third and fourth groups formed was a robust artificial bone block, no signs of implant dislocation were observed. Determined was the full osteointegration of the porous structure of the fixer in the contact «implant-bone» zone. The newly formed bone tissue surrounded the implant in a muft-like fashion and grew into its porous structure, grew into the periosteal zone of adjacent vertebral bodies, well adhering with their surface. **Conclusion.** The proposed method of correction of osteoreparation disorders can be considered as an alternative to osteoplastic operations with the transplantation of massive bone grafts, as well as in conditions of systemic disorders of the osteopoietic function with a critical shortage of endogenous progenitors of bone cells. **Keywords:** bone marrow stromal cells, reparative osteogenesis, spondylosyndesis.

Источником образования костной ткани при репаративном остеогенезе служат стволовые мезенхимальные клетки, обладающие способностью к остеобластической дифференцировке.

Мы разработали собственный оригинальный способ создания локальной иммобилизованной популяции аутологичных стромальных клеток в зоне костного дефекта на твёрдофазовом пористом носителе. Этот способ основан на прямой пересадке идентифицированных собственных остеогенных клеток-предшественниц в виде фиксированной монокультуры с целью повышения качества и ускорения остеорепаляции в неблагоприятных условиях тканевого дефекта.

Целью проводимого исследования стала оценка способности аутологичных иммобилизованных стромальных клеток костного мозга обеспечивать эффективную репарацию с формированием полноценного костного блока в зоне межтелового дефекта двигательного сегмента позвоночника после тотального удаления межпозвонкового диска.

#### Модель эксперимента

В проведённом исследовании были использованы 24 взрослых беспородных разнополых собаки. Животные были сертифицированы и аккредитованы Управлением ветеринарии по Новосибирской области РФ с проведением всех процедур в строгом соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Средняя масса тела животных составляла 18,3 кг, средний диаметр тел поясничных позвонков по данным рентгенографии в двух стандартных проекциях — 18,6 мм. Всем животным в условиях экспериментальной операционной с соблюдением стандартных требований асептики и антисептики были выполнены:

- пункция гребня крыла правой подвздошной кости с аспирацией 10 мл костного мозга;
- тотальная дискэктомия на уровне тел VII и VIII поясничных позвонков с замещением межтелового дефекта пористым металлическим цилиндром из никелида титана соответствующей формы и размера.

В качестве обезболивания при выполнении операций была использована многокомпонентная внутримышечная анестезия с применением в качестве базисного препарата кетамин в терапевтической дозе из расчёта на массу тела животного без интубации трахеи. Все живот-

ные случайным образом были разделены на четыре группы, по 6 в каждой. В первой группе межтеловый дефект заполняли только пористым металлическим цилиндром из никелида титана соответствующей формы и размера, во второй группе — фракцией моноклеарных клеток костного мозга, в третьей — фракцией стромальных клеток, в четвёртой — фракцией выращенных в культуре стромальных клеток. Умерщвление животных для проведения морфологического исследования проводили по стандартной методике с применением кетамин-этаназии в установленные сроки.

#### Изоляция и культивирование стромальных стволовых клеток собак

Каждый аспират костного мозга собирали в стеклянный флакон, содержащий 1 мл солевого раствора гепарина (1000 ЕД/мл). В лабораторном блоке флакон подвергали инкубации при 37 °С в течение 40 мин. После гравитационного разделения цельного костного мозга в отдельный флакон собирали верхнюю фракцию, состоящую из клеток лейкоцезви в аутоплазме. После центрифугирования (1500 об/мин, 8 мин) надосадок, содержащий аутоплазму, собирали в отдельный стерильный флакон, а осадок клеток лейкоцезви ресуспендировали в 20 мл фосфат-буферного изотонического раствора натрия хлорида, содержащего 10 ЕД/мл гепарина. Затем клетки лейкоцезви настилали на раствор фиколла-верографина (1,078 г/л) и центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин. Собранные из интерфазы костномозговые моноклеарные клетки трехкратно отмывали и ресуспендировали в среде DMEM («Sigma-Aldrich»). Получив гомогенную клеточную взвесь, подсчитывали общее количество выделенных клеток (в среднем  $8,5 \times 10^6$ /мл), оценивали их жизнеспособность после окраски трипановым синим.

Полученную фракцию прилипающих к пластику костномозговых клеток дополнительно культивировали в среде DMEM, дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкМ аскорбата-дифосфата, 0,1 мкМ дексаметазона, 0,3 мг/мл L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В таких условиях клетки культивировали в течение 21 сут с заменой культуральной среды через каждые 5 сут. Общее количество клеток к завершению культивирования составило в среднем  $1,2 \times 10^6$ /мл.

### Подготовка пористого металлического носителя из никелида титана

За сутки до иммобилизации стромальных стволовых клеток цилиндрическую заготовку соответствующего размера обезжировали, дезинфицировали, автоклавировали, затем инкубировали 2 ч при 37 °С в растворе коллагена (2 мг/мл) с 0,1 М уксусной кислоты, затем троекратно отмывали, высушивали в ультрафиолетовом ламинаре с вертикальным током воздуха. После этого заготовку повторно инкубировали 18 ч при 37 °С в среде DMEM, содержащей 0,4% раствор желатиниола и остеогенный индуктор β-глицерофосфат в концентрации 3 мг/мл.

Клеточную взвесь медленно инъецировали в разных точках подготовленной каркасной конструкции из никелида титана. Фиксацию клеток проводили при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 30 мин. Затем помещали подготовленный клеточный носитель с иммобилизованными стромальными (мезенхимальными) клетками в стерильный флакон, содержащий среду DMEM с 10% аутоплазмы, укупоривали, маркировали и транспортировали из лабораторного блока в операционную.

### Результаты

Оценка результатов исследования проведена с использованием рентгенографии в двух стандартных проекциях, визуальной оценки удалённого хирургическим путём препаратов позвоночного сегмента, а также гистологического исследования.

В первой (контрольной) группе животных выявлены отчётливые признаки замедленного формирования переднего костного блока, образование гипертрофического межтелового псевдоартроза. Гистологическое исследование показало формирование грубой фиброзной капсулы в зоне контакта «имплантат-кость», избыток хрящевой ткани, малочисленность и низкую пролиферативную активность остеобластов и гипоплазию сосудов.

Во второй группе животных на поздних сроках исследования определялся формирующийся искусственный костный блок с паравер-

тебральным гиперостозом. Рентгенологически выявлена микродислокация имплантата с его протрузией в тело смежного позвонка и частичная остеоинтеграция с пористой структурой фиксатора в зоне контакта «имплантат-кость». Гистологически образование костной ткани шло по типу вторичного остеогенеза с формированием избытка хрящевой ткани.

В третьей и четвёртой группах к 6-му месяцу исследования формировался полноценный искусственный костный блок. Достоверных различий в сроках и морфологических параметрах формирования костного блока между этими двумя группами не выявлено. Признаков дислокации имплантата не отмечено. Определялась полная остеоинтеграция с пористой структурой фиксатора в зоне контакта «имплантат-кость». Гистологически выявлены признаки первичного остеогенеза с полноценной остеорепарацией. Новообразованная костная ткань муфтообразно окружала имплантат и врастала в его пористую структуру, прорастала в периостальную зону тел смежных позвонков, прочно спаиваясь с их поверхностью.

### ВЫВОДЫ

1. Аутотрансплантация иммобилизованных стромальных клеток костного мозга может ускорять новообразование костной ткани при межтеловом спондилодезе после тотального удаления межпозвонкового диска.
2. Биоинертный пористый устойчивый к резорбции клеточный носитель из никелида титана обеспечивает продолжительную фиксацию и удержание клеточного материала в виде стабильной трёхмерной клеточной культуры.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов С.Ю., Кузнецов Г.В., Чайлахян Р.К. и др. Перспективы применения в стоматологии материалов «Биоматрикс» и «Алло-матрикс-имплант» в сочетании с остеогенными клетками-предшественниками костного мозга // *Клин. имплантол. и стоматол.* — 2001. — №3-4. — С. 37-40.