

## КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ

### Трансплантация аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на деминерализованном костном матриксе при лечении ложных суставов длинных трубчатых костей

Е.А. Щепкина<sup>1,3</sup>, П.В. Кругляков<sup>2</sup>, Л.Н. Соломин<sup>1</sup>, А.Ю. Зарицкий<sup>3</sup>, В.А. Назаров<sup>1</sup>, С.В. Вийде<sup>2</sup>, Е.В. Шведова<sup>2</sup>, Р.М. Тихилов<sup>1</sup>, Д.Г. Польшцев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росмедтехнологий», Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург

<sup>3</sup> ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава», Санкт-Петербург

#### Transplantation of autologous mesenchymal stem cells on demineralized bone matrix in treatment of pseudoarthrosis of long bones

E.A. Shchepkina<sup>1,3</sup>, P.V. Kruglyakov<sup>2</sup>, L.N. Solomin<sup>1</sup>, A.Yu. Zaritsky<sup>3</sup>, V.A. Nazarov<sup>1</sup>, S.V. Viyde<sup>2</sup>, E.V. Shvedova<sup>2</sup>, R.M. Tykhilov<sup>1</sup>, D.G. Polyntsev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Russian R.R. Wreden State Research Institute of Traumatology, Saint-Petersburg

<sup>2</sup> Trans-Technologies Ltd., Saint-Petersburg

<sup>3</sup> Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg

Представлены результаты клинической апробации метода лечения ложных суставов (приоритет от 23.05.06 г., регистрационный номер 2006117605) с использованием биотрансплантата, изготовливаемого путем заселения аутогенными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК) деминерализованного костного аллотрансплантата с плотностью 7–10 млн на 1 см<sup>2</sup>. Проведено лечение ложных суставов бедренной и большеберцовой костей у 10 пациентов, во всех случаях использовали чрескостный остеосинтез. При неосложненном течении послеоперационного периода сроки демонтажа аппарата и восстановления опороспособности конечности составили от 3 до 5 месяцев, что сравнимо со сроками сращения переломов этой же локализации. По данным рентгенографии и компьютерной томографии плотность трансплантата прогрессивно нарастала без предварительной фазы резорбции, сращение происходило преимущественно через трансплантат, что позволяет предположить не только его остеоиндуктивное воздействие, но и его остеокондуктивную роль.

**Ключевые слова:** ложные суставы, аутогенные мезенхимальные стволовые клетки, деминерализованные костные трансплантаты, чрескостный остеосинтез.

#### Введение

Проблема лечения ложных суставов до настоящего момента остается актуальной для современной травматологии и ортопедии. Повышение хирургической активности в последние десятилетия не только не решило, но и не уменьшило проблему несращения переломов. На настоящий момент можно выделить следующие направления в лечении ложных суставов: 1) применение чрескостного остеосинтеза с направленным механическим (компрессия–дистракция) воздействием на патологический очаг [1–6]; 2) совершенствование методов свободной костной пластики ауто- и аллотрансплантатами [7–10]; 3) пластика кровоснабжаемыми комплексами тканей [11]; 4) применение клеточных техно-

The article deals with the results of clinical trial-1 of a treatment modality of pseudoarthrosis (priority on the 23<sup>rd</sup> May, 2006, file number 2006117605) using biotransplant that is demineralized bone allotransplant colonized by autologous mesenchymal stromal cells with the density of 7–10×10<sup>6</sup> in 1cm<sup>2</sup>. Pseudoarthrosis of femoral bones and tibia was treated in 9 patients, with transosseous osteosynthesis being used in every case. In uncomplicated postoperative period the apparatus was dismantled and support ability of the leg was restored in 3 to 5 months, that is comparable to the time of healing of fractures of the same location. According to the X-ray and CT data the transplant density increased progressively without preliminary resorbition, consolidation occurred mainly via transplant that allows to suppose not only osteoinductive influence, but also osteoconductive role.

**Key words:** pseudoarthrosis, autologous mesenchymal stem cells, demineralized bone transplant, transosseous osteosynthesis.

логий. В частности, предложена стимуляция процессов костеобразования путем введения в область ложного сустава клеточного эмбрионального ксенотрансплантата [12], ауто-трансплантация костного мозга [13, 14], введение протеиновых субстанций [15, 16], культивированных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток (мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, ММСК) [17–19].

Основной проблемой при инъекционном введении клеточного материала является то, что для дифференцировки клетки нуждаются в наличии поверхности для прикрепления, обладающей высокоадгезивными свойствами, и среде для осмотического питания, которые отсутствуют в рубцово-измененных тканях ложного сустава. Вследствие

этого большая часть клеток гибнет или мигрирует за пределы области-мишени. Процессы костеобразования и перестройки при различных вариантах ауто- и аллопластики протекают длительно; при этом происходит прорастание новообразованной костной ткани в область пластики со стороны костных отломков, ауто- и аллотрансплантаты проходят стадию частичной резорбции [20, 21]. Представляется целесообразным совместить свойства деминерализованных костных трансплантатов и клеточного материала. Трансплантаты на основе деминерализованного костного матрикса и культивированных костномозговых фибробластов использовались с положительным результатом в эксперименте [13] и клинике [17]. На современном этапе наиболее целесообразным представляется использование иммобилизованных ММСК на различных пористых матрицах [22, 23].

В эксперименте было получено костеобразование в деминерализованном трансплантате при заселении его сингенными ММСК [25]. Это явилось основой для разработки метода лечения ложных суставов путем трансплантации аутогенных ММСК с применением биотрансплантата на основе деминерализованного костного матрикса (приоритет от 23.05.06 г., регистрационный номер 2006117605). Исследование утверждено ученым советом ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росздрав» (г. Санкт-Петербург) и разрешено этическим комитетом.

Предлагаем результаты клинической апробации предложенного метода, который в клинических условиях включал подготовку биотрансплантата, хирургический этап лечения и послеоперационный период.

### Материал и методы

Способ апробирован при лечении ложных суставов большеберцовой и бедренной костей у 9 пациентов на 10 сегментах. Все пациенты давали добровольное информированное согласие на участие в клинической апробации.

В исследование включены пациенты в возрасте от 25 до 59 лет. У трех пациентов образование ложного сустава произошло после консервативного лечения перелома, у 7 пациентов – после хирургического лечения, при этом пациенты переносили от одной до четырех операций остеосинтеза (погружного и внеочагового) на поврежденном сегменте. Длительность заболевания составляла от 6 месяцев до 4 лет. У трех пациентов в анамнезе имелись указания на хронический остеомиелит. У них лечение ложного сустава производилось при достижении стойкой ремиссии после радикальной хирургической обработки очага остеомиелита. Критерием для включения пациента в исследование была длительность ремиссии более 6 месяцев.

Аллергических и пирогенных реакций на введение клеточного материала не отмечено. Температурная реакция в послеоперационном периоде колебалась в пределах субфебрильной в течение 3–5 дней. Отек на уровне послеоперационной раны в первую неделю был незначительный: +1–3 см; за исключением одного пациента с сопутствующей сердечно-сосудистой патологией, у которого отек на 1–2 сутки после операции составил +5 см. Сроки демонтажа аппарата внешней фиксации при стандартном неосложненном течении послеоперационного периода составили от 3 до 5 месяцев с восстановлением опороспособности конечности. В двух случаях при смещении трансплантата в результате последующих манипуляций фиксация продолжалась 7 месяцев. Гипсовая иммобилизация после демонтажа аппарата внешней фиксации не использовалась.

### Выделение и культивирование ММСК

Получение костного мозга производили путем пункции подвздошной кости. Забирали 15–30 мл костного мозга, из которого выделяли аутогенные ММСК. Для этого образец костного мозга фракционировали методом центрифугирования на фиколле (плотность 1077 г/л), отбирали мононуклеарную фракцию. Отобранный клеточный материал отмывали от фиколла питательной средой DMEM (Hyclone, Новая Зеландия) методом центрифугирования, клеточный осадок помещали в среду культивирования, содержащую DMEM (Hyclone, Новая Зеландия), с 20% сыворотки эмбрионов коров (Hyclone, Новая Зеландия) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Hyclone, Новая Зеландия) и высевали на посуду для культивирования с плотностью  $1,27 \times 10^2$  кл/см<sup>2</sup>. Клетки культивировали в монослое, культуру пересевали каждые 7 суток с исходной плотностью  $1,27 \times 10^3$  кл/см<sup>2</sup>. Для посева культуры ММСК использовали раствор трипсина и ЭДТА (Hyclone, Новая Зеландия). Замену питательной среды проводили каждые 3 суток.

### Фенотипирование ММСК

Фенотипирование ММСК проводили на проточном цитофлуориметре Coulter Epics XL (Beckman, Coulter США). ММСК окрашивали антителами против негативных маркеров CD45 и CD34 (Beckman, Coulter США) и антителами против позитивных маркеров CD44, CD90, CD105, CD106 (Beckman, Coulter США) (рис. 1).

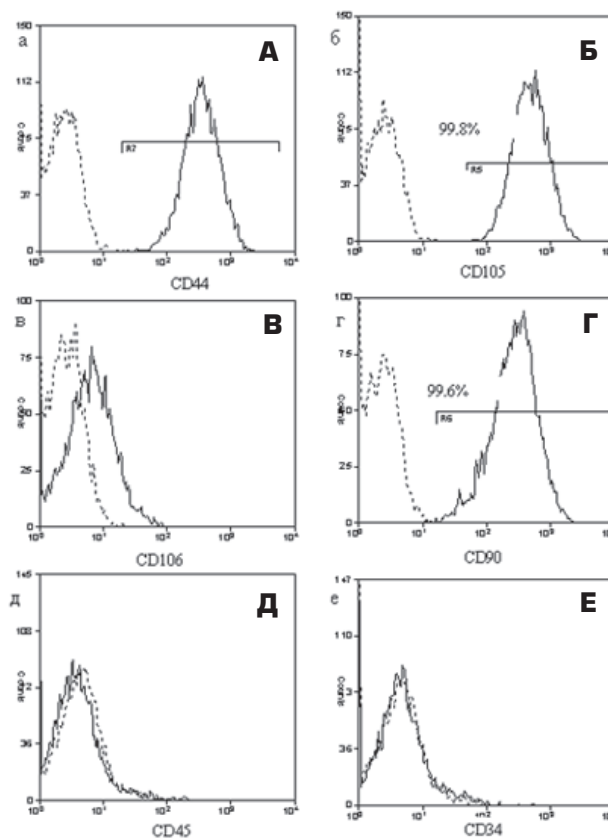


Рис. 1. Результаты иммунофенотипирования культуры ММСК человека после третьего пассажа: А – 99,8% ММСК CD44<sup>+</sup>; Б – 99,8% ММСК CD105<sup>+</sup>; В – 99% ММСК CD106<sup>+</sup>; Г – 99,6% ММСК CD90<sup>+</sup>; Д – 0% клеток гематопозитического ряда (CD45<sup>+</sup>); Е – 0% клеток гематопозитического ряда (CD34<sup>+</sup>). Пунктирными линиями обозначены диаграммы изотипического контроля



Для окрашивания антителами против поверхностных маркеров клетки снимали с чашек раствором трипсина и ЭДТА (Nuclope, Новая Зеландия), промывали два раза PBS, затем на 1 ч переносили в раствор моноклональных антител, конъюгированных с флюорохромом, в разведении 1:20. Далее клетки промывали два раза PBS и оценивали интенсивность свечения. Фенотипирование проводили после второго пересева культуры и перед подготовкой биотрансплантата.

#### Подготовка биотрансплантата

В качестве матрикса использовали цельные фрагменты деминерализованных костных аллотрансплантатов из трубчатой кости которые изготавливают по стандартным сертифицированным методикам в отделении консервации тканей ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росздрава». Перед работой с клеточным материалом трансплантаты предварительно отмывали в среде Хенкса в течение 24–48 часов для создания необходимого pH среды. Аутогенные ММСК заселялись на поверхность деминерализованных костных аллотрансплантатов в течение 24–72 часов в среде с аутосывороткой с плотностью заселения 7–10 млн на 1 см<sup>2</sup> трансплантата (рис. 2). Транспортировка трансплантатов в операционную производилась в стерильных флаконах в среде на аутосыворотке при температуре +18°... +22°С.

#### Хирургический этап

Производили экономную резекцию костных отломков в области ложного сустава с иссечением склерозированных участков (до кровотокающей кости) и удалением замыкательных пластинок из костномозгового канала. При выраженном склерозе в концах костных отломков резецировали их в пределах здоровой костной ткани. После открытой адаптации через проксимальный и дистальный отломок вырезали паз размером до 5×1,5 см на всю толщину кортикального слоя (рис. 3А), в который помещали подготовленные трансплантаты, перекрывая зону ложного сустава, с заполнением костномозгового канала, и дополнительно укладывали трансплантаты параоссально (рис. 3Б), фиксируя их циркулярными швами. Оставляли активный вакуум-дренаж. Во всех случаях использовали внеочаговую фиксацию (рис. 3В). В послеоперационном периоде дренаж удаляли на 2–е сутки, после чего разрешали ходьбу; швы снимали через 12–18 дней. Дозированную нагрузку на оперированную конечность разрешали после снятия швов, полную после 2 месяцев фиксации. Проводили динамизацию аппарата внешней фиксации путем модульной трансформации [25]. Демонтаж аппарата

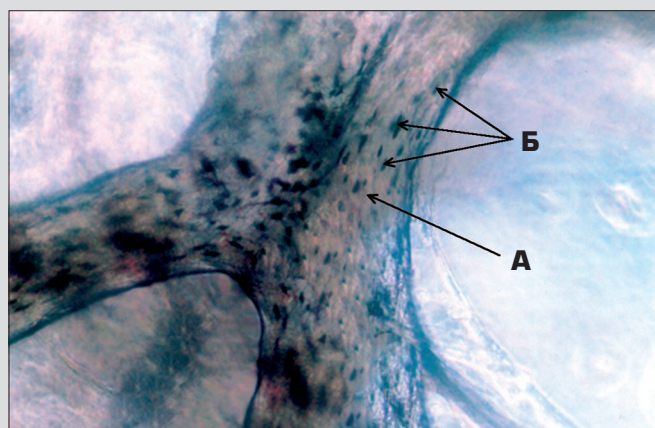


Рис. 2. Контроль заселения трансплантата:  
А – костный матрикс (ДКТ);  
Б – ММСК, ув. ×100

производили после достижения клинико–рентгенологических признаков консолидации после клинической пробы.

После операции и далее ежемесячно проводилась рентгенография, реовазография, денситометрия, компьютерная томография. После 3 месяцев наблюдения компьютерная томография производилась с большим интервалом.

#### Результаты

При анализе данных рентгенологического исследования и компьютерной томографии у пациентов, оперированных по предложенному способу, во всех случаях выявлялись очаги костеобразования в трансплантате. Плотность трансплантата по данным рентгенографии и компьютерной томографии прогрессивно нарастала, без предварительной фазы резорбции (рис. 4). В большинстве случаев образование «костной мозоли» на уровне контакта трансплантата с проксимальным и дистальным фрагментом происходило значительно быстрее, чем на стыке фрагментов, следовательно сращение происходило преимущественно через костный трансплантат (рис. 5, 6). В трансплантате образование компактной кости отмечено раньше, чем в других участках «костной мозоли». Полученные данные позволяют предположить не только остеоиндуктивное воздействие внесенного биотрансплантата, но и его остеокондуктивную роль.

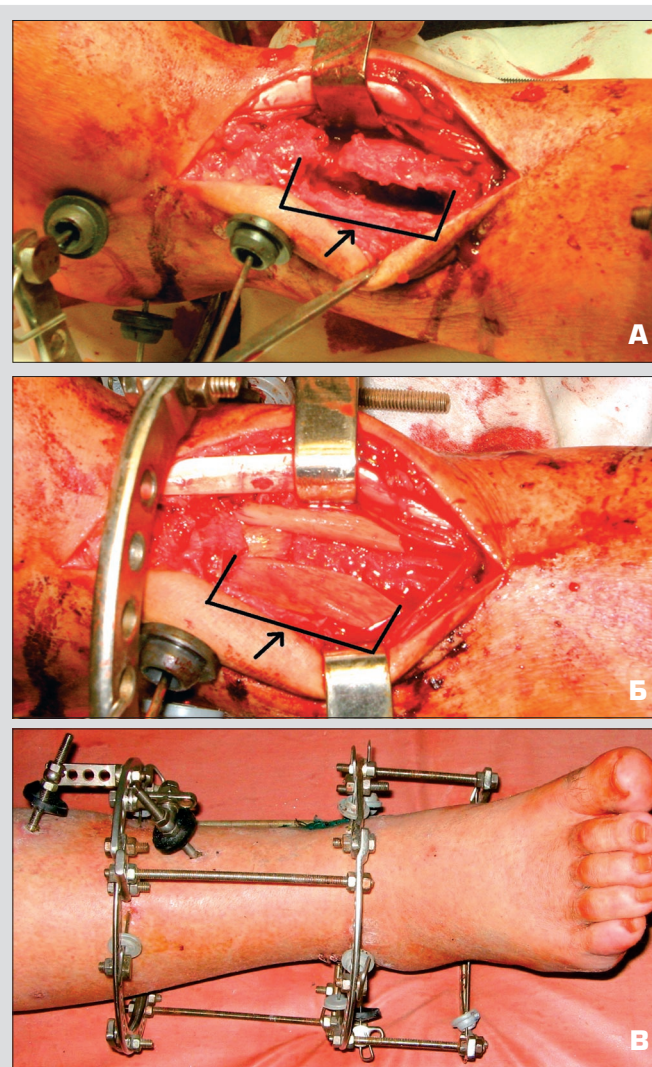


Рис. 3. Этапы операции:

А – выполнение пазы через костные фрагменты после открытой адаптации; Б – этап костной пластики; В – вид аппарата внешней фиксации после операции

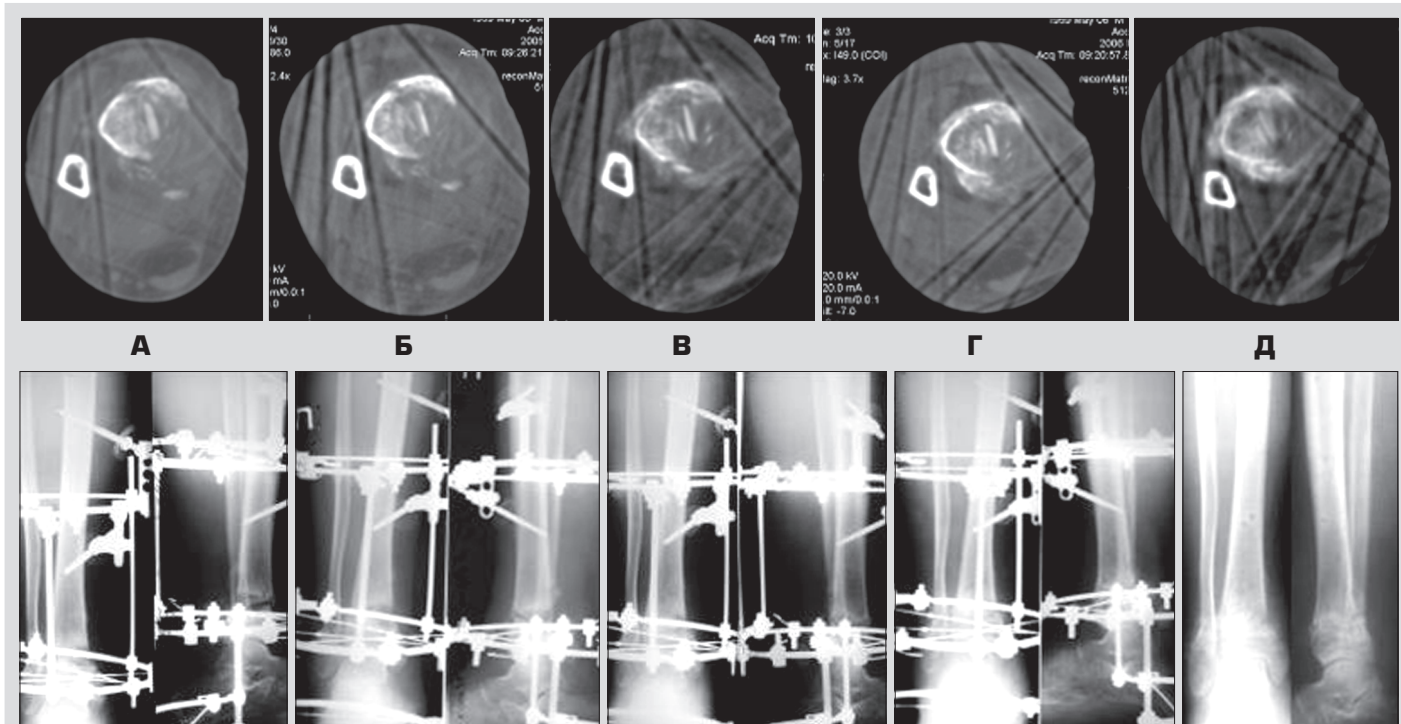


Рис. 4. Компьютерные томограммы и рентгенограммы области костной пластики правой большеберцовой кости больного Р. в процессе лечения: А – после операции; Б – через 1 месяц после операции; В – через 2 месяца после операции; Г – через 4 месяца после операции; Д – через 5 месяцев после операции

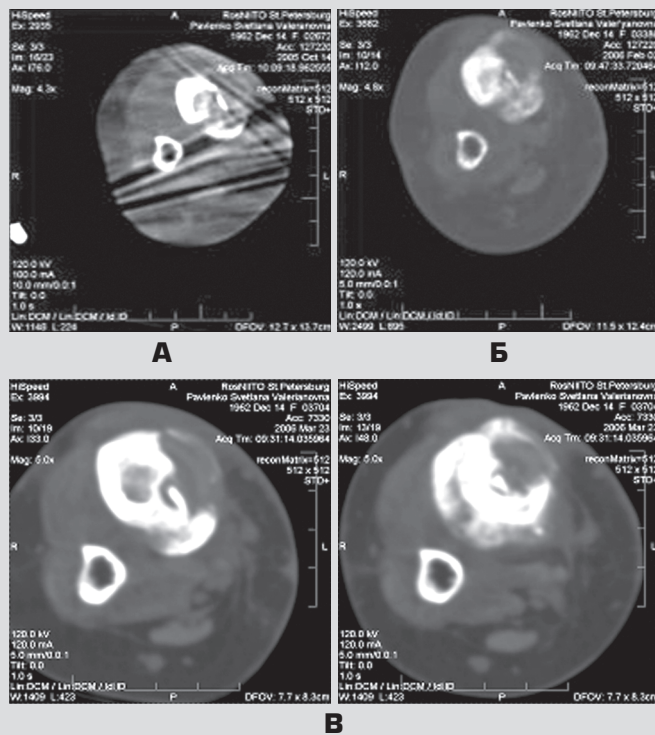


Рис. 5. Компьютерно-томографическое исследование костей правой голени больной П.: А – томографический срез на уровне трансплантата через 3 месяца после операции; Б – томографический срез на уровне трансплантата через 6 месяцев после операции; В – участки костеобразования между костными отломками и трансплантатом

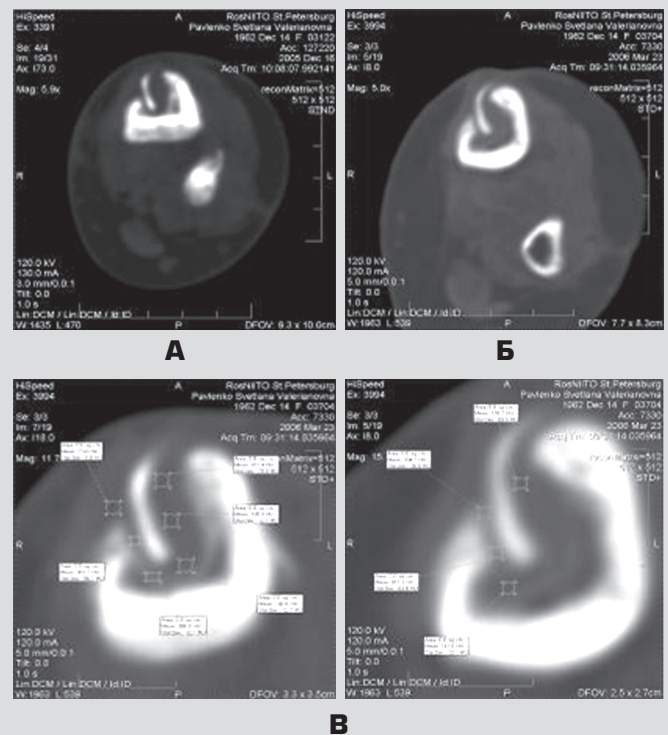


Рис. 6. Компьютерно-томографическое исследование костей левой голени больной П.: А – томографический срез на уровне трансплантата через 4 месяца после операции; Б – томографический срез на уровне трансплантата через 6 месяцев после операции; В – измерение плотности костной ткани между костными отломками и трансплантатом



*Клинические примеры**Пример 1.*

Пациентка П., 43 лет, поступила в клинику с диагнозом «Атрофические ложные суставы обеих большеберцовых костей. Сросшийся с угловой деформацией и укорочением (5 см) перелом левой бедренной кости. Хронический остеомиелит левой бедренной кости, фаза ремиссии» (рис. 7). В анамнезе: накостный остеосинтез левой бедренной и левой большеберцовой костей и внеочаговый остеосинтез правой большеберцовой кости в раннем периоде после травмы. В последующем – реостеосинтез бедренной кости в связи с переломом пластины, осложнившийся остеомиелитом. После санации очага остеомиелита перелом левой бедренной кости сросся в аппарате внешней фиксации с укорочением на 5 см. На правой и левой голени образование

ложных суставов. В последующем – дважды на левой голени и три раза на правой голени выполнялись операции внеочагового остеосинтеза с исходом в ложный сустав. Пациентке одновременно выполнена резекция ложных суставов правой и левой большеберцовых костей, резекция правой и левой малоберцовых костей, костная пластика области ложных суставов деминерализованными костными аллотрансплантатами, заселенными аутогенными ММСК, наложены аппараты внешней фиксации (рис. 8). В послеоперационном периоде при выполнении дополнительных репозиционных мероприятий произошло смещение трансплантата из костного паза на правой большеберцовой кости. Аппарат внешней фиксации с левой голени демонтирован через 3 месяца после операции, с правой через 7 мес. после операции при клико-рентгенологической картине сращения (рис. 9).



Рис. 7. Пациентка П. при поступлении в клинику:

А – рентгенограммы и внешний вид правой голени;

Б – внешний вид пациентки (укорочение левой нижней конечности за счет бедренного сегмента);

В – рентгенограммы и внешний вид левой голени



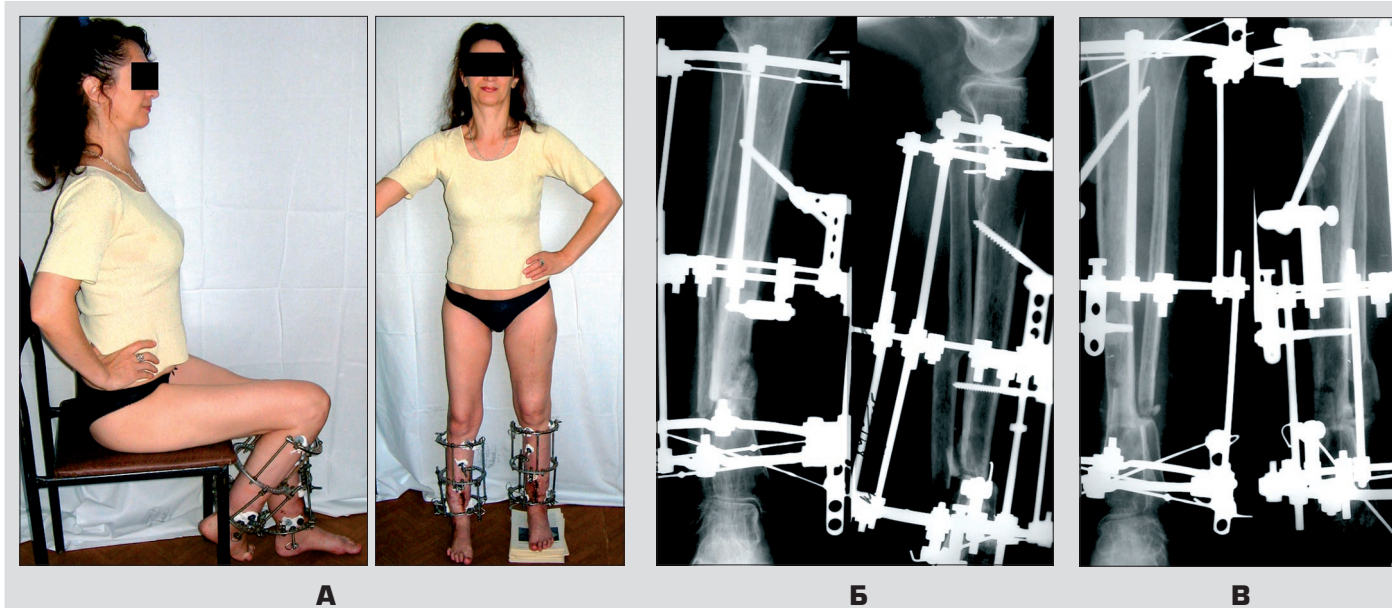


Рис. 8. Пациентка П. в процессе лечения:  
 А – внешний вид пациентки (компенсация укорочения левого бедра);  
 Б – рентгенограммы правой голени;  
 В – рентгенограммы левой голени

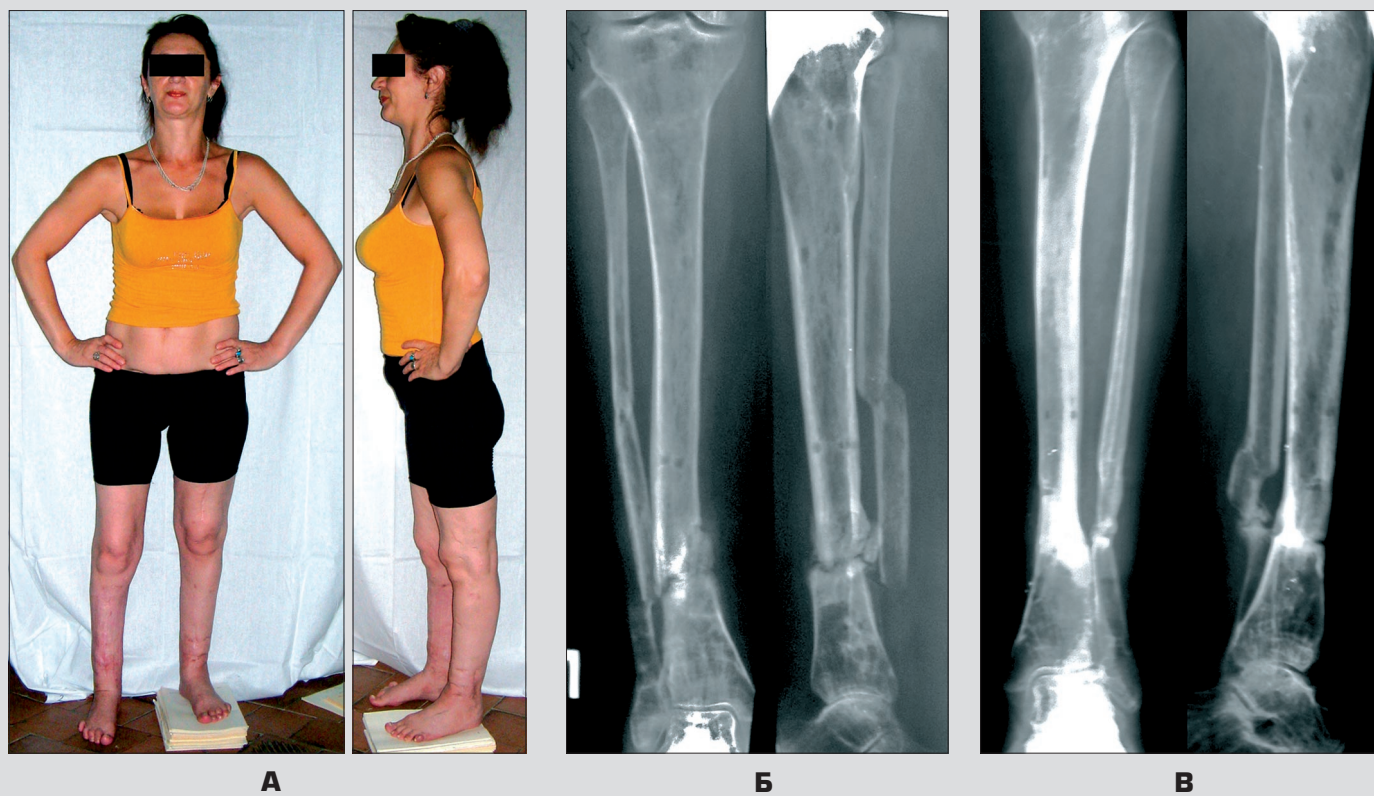


Рис. 9. Пациентка П. после демонтажа аппаратов внешней фиксации:  
 А – внешний вид пациентки (компенсация укорочения левого бедра);  
 Б – рентгенограммы правой голени;  
 В – рентгенограммы левой голени



**Пример 2.**

Пациент Р., 47 лет, поступил в клинику с диагнозом «Ложный сустав правой большеберцовой кости с варусно-анте-руквационной деформацией, сросшийся с деформацией перелом правой малоберцовой кости» (рис. 10). После травмы лечился консервативно в гипсовой повязке. Пациенту выполнена экономная резекция костных фрагментов, одномоментное устранение деформации в аппарате внешней фиксации, костная пластика ложного сустава деминерализованными костными аллотрансплантатами, заселенными аутогенными

ММСК (рис. 11). Аппарат внешней фиксации демонтирован при клинико-рентгенологической картине сращения через 5 месяцев после операции (рис. 12).

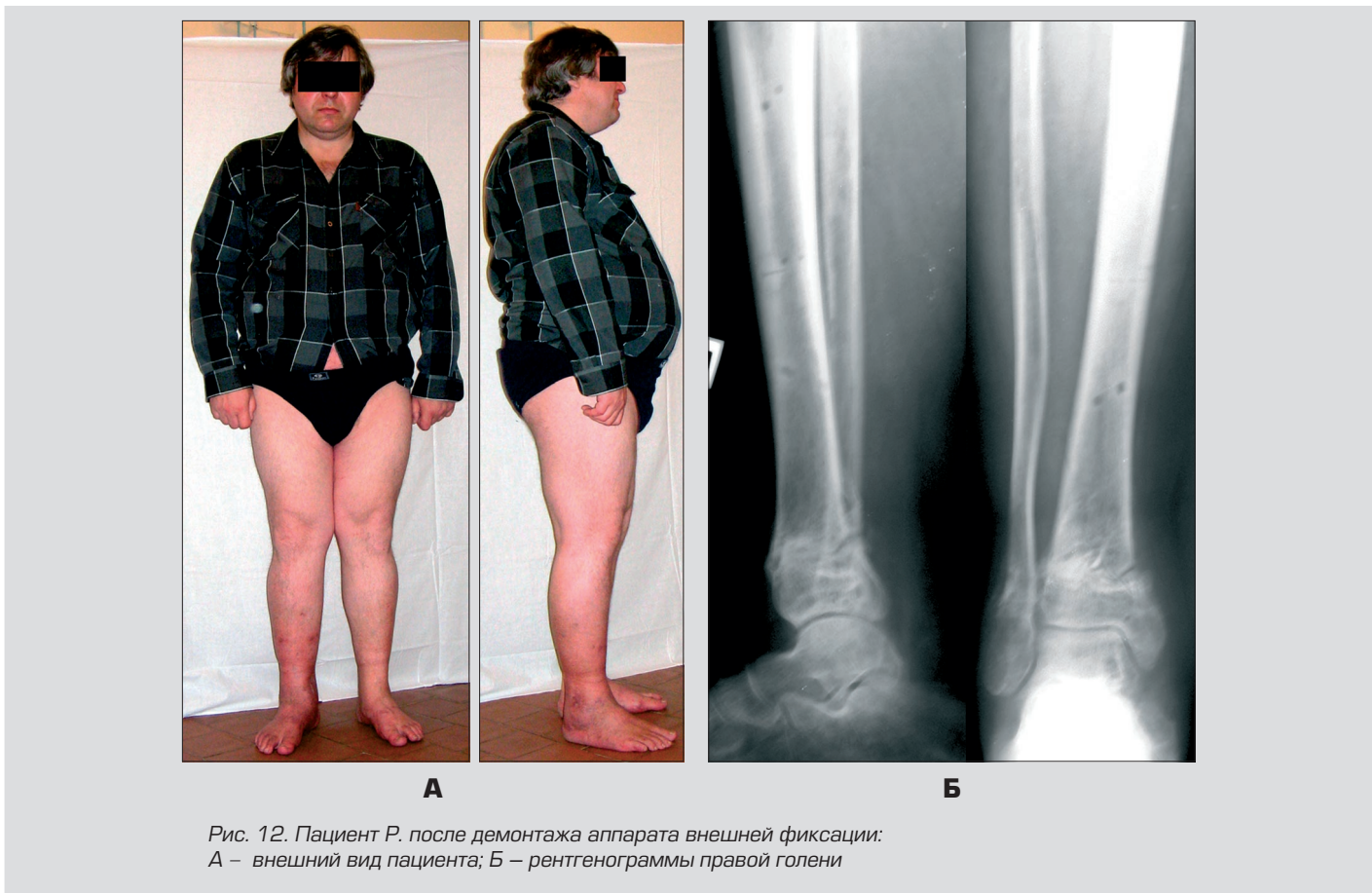
Таким образом, при использовании трансплантатов, заселенных аутогенными ММСК, в обследованной группе больных консолидация в области ложного сустава в среднем соответствовала срокам сращения переломов данной локализации. Полученные данные позволяют считать целесообразным дальнейшие исследования клинического применения предложенного метода.



Рис. 10. Пациент Р. при поступлении в клинику:  
А, Б – внешний вид пациента; В – деформация правой голени; Г – рентгенограммы правой голени



Рис. 11. Пациент Р. в процессе лечения:  
А – внешний вид пациента; Б – рентгенограммы правой голени



## ЛИТЕРАТУРА:

1. Гюльназарова С.В., Штин В.П. Восстановление кости при лечении псевдоартрозов методом дистракции (Эксперим. исслед.). Ортопед, травматол. 1973; 3: 40–6.
2. Илизаров Г.А., Каплунов А.Г., Шпаер Л.И. Лечение ложных суставов голени методами компрессионно-дистракционного остеосинтеза по Г.А. Илизарову. Чрескостный компрессионный и дистракционный остеосинтез в травматологии и ортопедии; Курган; 1972; 1: 115–26.
3. Стецула В.И., Веклич В.В. Основы управляемого чрескостного остеосинтеза. 2003; М.: Медицина.
4. Шевцов В.И., Макушин В.Д., Куфтырев Л.М. Псевдоартрозы, дефекты длинных костей верхней конечности и контрактуры локтевого сустава (базовые технологии аппаратом Илизарова). 2001; Курган: «Зауралье».
5. Aggarwal N.K. et al. Role of external fixators in the management of long bone non-unions. SICOT: Final Program & Abstract Book; Sydney; 1999: 221.
6. Mora R. Nonunion of the Long Bones. Milan: Springer-Verlag Italia. 2006: 285.
7. Мовшович И.А. Оперативная ортопедия (Руководство для врачей). 2-е изд., перераб. и доп. 1994; М.: Медицина: 32.
8. Гайдуков В.М. Ложные суставы. 1995; СПб: Наука.
9. Калугин А.В. Болтрукевич С.И., Карев Д.Б. Аллогенный деминерализованный костный матрикс как стимулятор репаративного остеогенеза при несросшихся переломах и ложных суставах костей конечностей. Деминерализованный костный трансплантат и его применение. 1993; СПб: 108–11.
10. Швец А.И., Пикалюк В.С., Тамара И.В. и др. Применение деминерализованного костного матрикса в лечении больных с ложными суставами и замедленной консолидацией костей голени. Деминерализованные костные трансплантаты и их использование в восстановительной хирургии. 1996; СПб: 102–4.
11. Белоусов А.Е. Пластическая, реконструктивная и эстетическая хирургия. 1998; СПб: «Гиппократ»: 550–2.
12. Белоусов В.Д., Чобану А.А., Чобану Ф.И. Консервативное лечение ложных суставов длинных трубчатых костей (клинические аспекты клеточной ксеноблефопластики). 1990; Кишинев: «ШТИИИИЦА».
13. Сирый О.М. Аутоотрансплантация костного мозга при повреждениях костной ткани: Дис. ...канд. мед. наук. М.; 1987.
14. Goel A, Sangwan S.S., Siwach R.C. et al. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. Injury. 2005; 36: 203–6.
15. Termaat M.F., Den Boer F.C., Bakker F.C. et al. Bone Morphogenetic Proteins. Development and Clinical Efficacy in the Treatment of Fractures and Bone Defects. J. Bone Joint Surg. Am. 2005; 87(9): 1292–7.
16. Lietman S.A., Inoue N., Rafiee B. et al. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on allograft incorporation. J. Bone Joint Surg. Am. 2005; 87: 1367–78.
17. Осебяни И.А., Чайлахян Р.К., Гарибян Э.С., Айвазян В.П. Лечение несросшихся переломов, ложных суставов и дефектов длинных костей трансплантацией костномозговых фибробластов, выращенных in vitro и импрегнированных в губчатый костный матрикс. Ортопед, травматол. 1987; 9: 59–61.
18. Сизиков М.Ю., Останин А.А., Султанмуратов Ю.М. и др. Терапия посттравматических псевдоартрозов костей конечностей посредством направленной остеиндукции аутологичными стромальными стволовыми клетками. Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении; 2005 24–25 мая; Москва; 2006: 95–7.
19. Селедцов В.И., Гольник В.Н., Белогородцев С.Н. и др. Стволовые клетки в травматологии и хирургии. Современные методы лечения больных с травмами и их осложнениями; материалы Всероссийской научно-практической конференции. Курган; 2006; 207–9.
20. Виноградова Т.П., Лаврищева Г.И. Регенерация и пересадка костей. 1974; М.: Медицина.
21. Бок В.Ф. Рентгенологическая характеристика изменений в костном гомотрансплантате. Гомопластика в травматологии и ортопедии. Труды ЛНИИТО им. Р.Р.Вредена. 1972; Л.: 39–49.
22. Воложин А.И., Денисов-Никольский Ю.И., Лосев В.Ф. и др. Применение мезенхимальных стволовых клеток для придания остеиндуктивных свойств имплантационным материалам. Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении; 2005 24–25 мая; Москва; 2006: 56–8.
23. Bruder S.P., Kraus K.H., Goldberg V.M. et al. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. J. Bone Joint Surg. Am. 1998; 80: 985–96.
24. Кругляков П.В., Соколова И.Б. и др. Влияние сингенных МСК на восстановление костной ткани при имплантации деминерализованного костного матрикса. Цитология 2005; 47(6): 466–76.
25. Назаров В.А. Биомеханические основы модульной компоновки аппаратов для чрескостного остеосинтеза длинных трубчатых костей: Дис. ...канд. мед. наук. СПб; 2006.

*Поступила 20.04.2007*