

ТЕХНОЛОГИЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ПОЛОСТЕЙ АУТОЛОГИЧНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ НА КОЛЛАГЕНОВОЙ МАТРИЦЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ

DOI: 10.17691/stm2021.13.1.05

УДК 616.71–089.26–002.1:576.3/.7:577.017.22

Поступила 25.08.2020 г.



В.Н. Митрофанов, к.м.н., зав. отделением гнойной хирургии Университетской клиники;
О.П. Живцов, к.м.н., научный сотрудник, травматолог отделения гнойной хирургии Университетской клиники;
Н.Ю. Орлинская, д.м.н., профессор, зав. отделением патологической анатомии Университетской клиники;
Д.В. Давыденко, к.б.н., научный сотрудник отделения патологической анатомии Университетской клиники;
И.Н. Чарыкова, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории биотехнологий
Университетской клиники;
Д.Я. Алейник, к.м.н., старший научный сотрудник НИИ экспериментальной онкологии
и биомедицинских технологий

Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1,
Н. Новгород, 603005

Цель исследования — разработать технологию восстановления остеомиелитического дефекта кости с помощью аутологичных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) на коллагеновой матрице и доказать ее эффективность.

Материалы и методы. Исследования проведены на 17 кроликах. Хирургический доступ осуществляли по передней поверхности проксимальной трети голени. Фрезой вдоль оси кости формировали дефект надкостницы, кортикального слоя и губчатого вещества размерами 8,0×4,0 мм, глубиной 4,0 мм. В качестве инфекционного возбудителя применяли штамм *Staphylococcus aureus*.

После формирования хронического остеомиелита животным обеих групп выполняли остеонекрэктомии. Опытной группе в костный дефект помещали аутологичные МСК на коллагеновом носителе «Коллатамп ИГ». МСК получали из жировой ткани и культивировали на матрице в течение 5 сут. Животным контрольной группы дефект замещали только коллагеновой матрицей без клеток.

Результаты. На 14-е сутки после операции по формированию хронического остеомиелита бактериологическое исследование раневого отделяемого из свища показало у всех животных наличие смешанной флоры: *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. По результатам рентгенологических, лабораторных и гистологических исследований было подтверждено формирование очага хронического остеомиелита.

Через 2 мес после пластики смоделированного дефекта гнойной раны морфологическое исследование показало, что у всех животных опытной группы отмечалось образование зрелой костной ткани. Пролиферация остеобластов на поверхности костных балок наблюдалась и в контрольной группе, однако остеоидную ткань различной степени зрелости чаще выявляли в группе кроликов, в которой использовалась матрица с аутологичными МСК (35,0 против 20,0% в группе контроля). Под влиянием аутологичных МСК на матрице произошло уменьшение фибрирования костного мозга (50,0 против 100,0% у кроликов только с аутопластикой) и образование хряща (30,0 и 66,7% соответственно). У животных опытной группы новообразованные костные балки выявлялись чаще (100,0 против 60,0% в группе контроля), были более зрелыми и эффективнее заполняли область дефекта.

Заключение. Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности использования коллагеновой матрицы с аутологичными МСК в качестве пластического материала для восполнения костных дефектов, образующихся после некрэктомии очага хронического остеомиелита.

Применение МСК на коллагеновой матрице способствует увеличению плотности заполнения костного дефекта; значительному ускорению образования костных балок по пути ремоделирования ткани вокруг матрицы с аутологичными клетками за счет наращивания ее объема вокруг имплантата; существенному снижению выраженности соединительно-тканного компонента остеогенеза и хондрогенеза.

Ключевые слова: хронический остеомиелит; мезенхимальные стволовые клетки; замещение костных дефектов; регенеративные технологии.

Как цитировать: Mitrofanov V.N., Zhivtsov O.P., Orlynskaia N.Yu., Davydenko D.V., Charykova I.N., Aleinik D.Ya. Technology for repairing osteomyelitic bone defects using autologous mesenchymal stromal cells on a collagen matrix in experiment. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(1): 42–51, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.1.05>

Для контактов: Живцов Олег Петрович, e-mail: zhivtsovoleg@gmail.com

Technology for Repairing Osteomyelitic Bone Defects Using Autologous Mesenchymal Stromal Cells on a Collagen Matrix in Experiment

V.N. Mitrofanov, MD, PhD, Head of the Department of Septic Surgery, University Clinic;
O.P. Zhivtsov, MD, PhD, Researcher, Physician of Trauma Surgery, Department of Septic Surgery, University Clinic;
N.Yu. Orlinskaya, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, University Clinic;
D.V. Davydenko, PhD, Researcher, Department of Pathological Anatomy, University Clinic;
I.N. Charykova, Physician of Clinical Laboratory Diagnostics, Laboratory of Biotechnology, University Clinic;
D.Ya. Aleinik, MD, PhD, Senior Researcher, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies

Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

The aim of the study was to develop a technology for repairing an osteomyelitic bone defect using autologous adipose tissue mesenchymal stromal cells (MSCs) bound to a collagen matrix and to test the efficacy of this technique.

Materials and Methods. The study was carried out with 17 rabbits. A bone defect was created using a milling cutter applied to the proximal third of the leg. The wound (8.0×4.0 mm and a depth of 4.0 mm) involved the periosteum, cortical layer, and cancellous substance. *Staphylococcus aureus* strain was used as an infectious agent.

After the development of chronic osteomyelitis, the animals underwent osteonecrectomy. In the study group, autologous MSCs in Collatamp EG collagen carrier were placed into the bone defect. MSCs were obtained from adipose tissue and cultured in the matrix for 5 days. In control, the defect was filled with the collagen matrix without cells.

Results. On day 14 upon the initiation of chronic osteomyelitis, bacteriological examination of the discharge from the fistula showed the presence of mixed bacterial flora (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) in all operated animals. Results of X-ray, laboratory, and histological tests confirmed the formation of a focus of chronic osteomyelitis.

Two months after the treatment (collagen with or without MSCs) began, all animals of the study group showed mature bone tissue regenerated in the affected zone. In the control group, proliferation of osteoblasts on the surface of the bone trabeculae was also observed; however, mature osteoid tissue was more often detected in the study group (35.0 vs 20.0% in control). In the study group (MSCs + collagen matrix), there was a decrease in bone marrow fibrosis (50.0 vs 100.0% in control) and cartilage formation (30.0 and 66.7%, respectively). After full treatment, newly formed bone trabeculae were detected more often (100.0 vs 60.0% in control); they were more mature and filled the defect area more efficiently.

Conclusion. Our results indicate that the use of a collagen matrix with autologous MSCs is a promising plastic material for repairing osteomyelitic defects following necrectomy.

The MSCs were able to increase the density of the filling material in the bone cavity, significantly accelerate the formation of bone beams around the matrix, and increase the tissue volume around the implant. The presence of MSCs significantly decreased the interference of a connective tissue component with osteogenesis and chondrogenesis.

Key words: chronic osteomyelitis; mesenchymal stem cells; repair of bone defects; regenerative technologies.

Введение

Одним из нерешенных вопросов травматологии и ортопедии является поиск остеопластического материала, обладающего остеокондуктивностью и остеоиндуктивностью в тканях, подвергшихся воздействию гнойного процесса [1–10]. В сложных клинических ситуациях при нарушении процессов восстановления тканей применяют клеточные технологии. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) благодаря своим уникальным свойствам считаются наиболее перспективным материалом для регенеративной медицины. Разработаны технологии получения МСК из разных

тканей взрослого организма, однако наиболее широко исследуют и используют клетки, выделенные из костного мозга, надкостницы и жировой ткани. Известно, что МСК жировой ткани и МСК костного мозга способны к остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировке. D.A. De Ugarte с коллегами [11] не обнаружили существенных остеогенных различий у клеток, выделенных из этих тканей. Другие исследователи [12, 13] продемонстрировали более высокий остеогенный потенциал МСК костного мозга и надкостницы по сравнению с МСК жировой ткани. Однако только из жировой ткани можно получить аутологичный клеточный материал с помощью минимально инвазивных процедур.

Использование аутологичных клеток минимизирует риск инфицирования, упрощает поиск и подбор доноров, снимает этические проблемы. Доступность и относительное изобилие МСК жировой ткани в отличие от клеток костного мозга способствуют постоянному интересу к их клиническому применению в качестве источника клеточного материала для регенерации кости [14, 15]. В экспериментальных исследованиях на животных моделях продемонстрировано эффективное восстановление костной ткани с помощью МСК из жировой ткани [16, 17].

Кроме того, отмечено улучшение остеогенных свойств этих клеток в процессе культивирования *in vitro* при воздействии на них различных факторов: химических (манипулирование концентрациями аскорбата и дексаметазона) и механических [18]. Таким образом, доступность необходимых для выделения МСК объемов жировой ткани и возможность усиливать остеогенный потенциал этих клеток на этапе подготовки свидетельствуют о перспективности их использования в клинической практике.

Ранее нами была доказана эффективность восстановления экспериментального костного дефекта у кролика с помощью конструкта на основе коллагеновой матрицы «Коллатамп ИГ» с аллогенными МСК [19]. Значительно более сложной и длительной задачей является восстановление целостности костных дефектов при хроническом остеомиелите с гнойно-деструктивными очагами инфекции.

Размеры дефектов костей при остеомиелитической патологии часто велики, что увеличивает потребность в подходящем остеопластическом материале [20, 21].

Для успешного внедрения методов регенеративной медицины в лечение хронического остеомиелита необходима разработка хирургической технологии применения МСК конкретно для данной патологии.

Цель исследования — разработать технологию восстановления остеомиелического дефекта кости с помощью аутологичных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани на коллагеновой матрице и доказать ее эффективность.

Материалы и методы

В исследование включены 17 кроликов породы серый великан 6–8-месячного возраста массой 1800–2100 г. Работа одобрена Этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета (Н. Новгород). Животные были разделены на 2 группы: опытную (n=10) и контрольную (n=7).

Техника моделирования первичного хронического остеомиелита. Модель отработывали в отделении экспериментальной хирургии с виварием Приволжского исследовательского медицинского университета согласно требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей

(Страсбург, 2006). Все манипуляции выполняли в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Выведение животных из эксперимента осуществляли воздушной эмболией под наркозом.

В качестве инфекционного возбудителя применяли штамм *Staphylococcus aureus*. Все процедуры и операции проводили под обезболиванием (Золетил 50 — 10 мг/кг + Ксила — 50 мг/кг).

Хирургический доступ осуществляли по передней поверхности проксимальной трети голени. Фрезой вдоль оси кости формировали дефект надкостницы, кортикального слоя и губчатого вещества размером 8,0×4,0 мм, глубиной 4,0 мм. Дефект инфицировали взвесью суточной культуры стафилококка в стерильном физиологическом растворе в дозе 40–45 млн. колониеобразующих единиц (КОЕ) и 0,2 г стерильного кварцевого песка на 1 кг массы тела животного. Завершали операцию наложением послойного узлового шва раны.

С целью хронизации гнойного воспаления одновременно с формированием свища реинфицировали костную полость культурой *Staphylococcus aureus* в дозе 15–20 млн. КОЕ на 1 кг массы тела кролика. Такие «подсевы» проводили трехкратно с интервалом 72 ч. Швы кожной раны снимали через 10 сут после оперативного вмешательства (рис. 1, а). Бактериологическое исследование раневого отделяемого из свища осуществляли на 14-е сутки после операции. У всех животных выявлена смешанная флора: *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Вокруг формирующегося участка абсцесса наблюдали скопление эозинофильных плазматических и лимфоидных клеток. В зоне воспаления лежали разрозненные безостеоцитные костные балки (рис. 1, б).

По результатам рентгенологических, лабораторных и гистологических исследований подтверждали формирование очага хронического остеомиелита.

Хирургическая санация и имплантация изучаемого материала. Животным обеих групп выполняли остеонекрэктомия. Опытной группе в костный дефект помещали аутологичные МСК на коллагеновом носителе «Коллатамп ИГ» (Collatamp EG; Suntacoll GmbH, Германия) (рис. 2), продемонстрировавшем наименьшую цитотоксичность по сравнению с другими коллагеновыми носителями [22]. Животным контрольной группы дефект замещали только коллагеновой матрицей без клеток.

Рентгенологическое исследование области хирургического вмешательства. Наблюдение за размерами дефекта, особенностями формы и структуры костной ткани в области очага, его точным расположением и конфигурацией осуществляли в день выведения животного из эксперимента с помощью рентгенографии в двух проекциях на аппарате DIRA-RC (Roesys GmbH, Германия), компьютерной томографии на аппарате Toshiba Aquilion 32 (Toshiba, Германия). Оценивали показатель рентгенологической

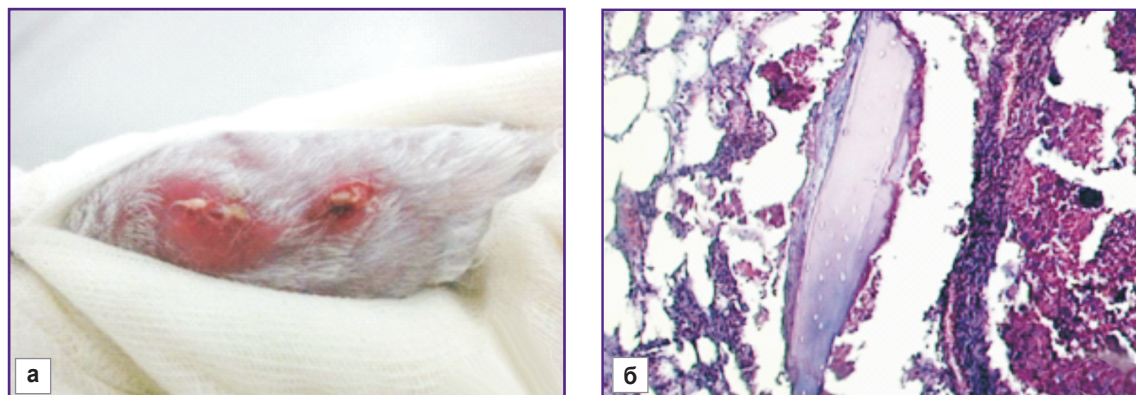


Рис. 1. Картина хронического остеомиелитического процесса у кролика:
а — клинические проявления; б — гистологическое исследование

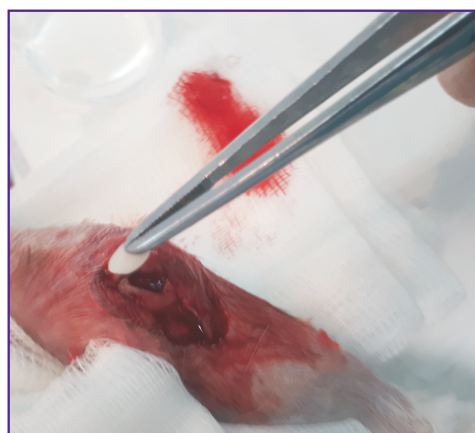


Рис. 2. Интраоперационный этап имплантации аутологических МСК на коллагеновой матрице

плотности содержимого костного дефекта в условных единицах Хаунсфилда (НУ).

Получение культуры аутологических МСК. В стерильных условиях операционной вивария одновременно с формированием первичного дефекта кости у животных из поясничной области забирали образцы жировой ткани (0,8–1,0 см³). Жировую ткань от каждого животного помещали в индивидуальную пробирку с транспортной средой (среда 199 или раствор Хенкса с антибиотиками — пенициллин/стрептомицин), маркировали в соответствии с обозначением животного и передавали в лабораторию. Из жировой ткани клетки выделяли с помощью тепловой ферментативной обработки коллагеназой 1-го типа (ООО «ПанЭко», Россия) в течение часа при 37°C и культивировали в среде α -МЕМ с добавлением 20% телячьей эмбриональной сыворотки, глутамина, антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) при абсолютной влажности, 37°C, 5% CO₂. Были использованы среды и реактивы фирмы ООО «ПанЭко», пластик фир-

мы Costar (США). После получения каждую культуру также маркировали в соответствии с обозначением животного. По достижении 60% субконфлюэнтного монослоя культуру пересеивали. В дальнейшем смену среды проводили каждые 2–3 дня. В экспериментах использовали культуру 3–4-го пассажа. Исходная плотность клеток составляла 5 тыс./см².

Состояние культуры контролировали в динамике с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI3000 В (Leica Microsystems, Германия) с программным обеспечением LAS v. 4.3 (Leica Microsystems). Фенотип клеток перед вводом в эксперимент определяли с помощью моноклональных антител CD44 FITC, CD105 PE, CD45 PE с соответствующим изотипическим контролем на цитофлуориметре FACScanto II (Becton Dickinson, США). Результаты выражали как долю клеток, несущих соответствующий маркер (в процентах). Дифференцировочный потенциал клеток оценивали на культуре 3-го пассажа. Остеогенную дифференцировку индуцировали с помощью комплекса дифференцировочных добавок: 1 ммоль/л дексаметазона, 5 мг/мл двухфосфатной аскорбиновой кислоты, 10 мМ глицерофосфата. Для индукции адипогенной дифференцировки клетки культивировали в среде с 1 ммоль/л дексаметазона, 2,5 мг/мл инсулина, 100 ммоль/л индометацина и 3,5 ммоль/л розиглитазона. В качестве специфических красителей использовали OilRed (Sigma-Aldrich, США) для окраски липидных вакуолей, ализариновый красный (Sigma-Aldrich) — для выявления солей кальция в процессе дифференцировки в остеобласты и остеокальцин.

Подготовка МСК и матрицы к введению животным. В экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* использовали клетки 3-го пассажа. Клетки снимали с поверхности пластика с помощью смеси трипсина с версеном, ресуспендировали, собирали в шприцы по 1 мл и вводили непосредственно в толщу образцов матрицы — коллагеновой губки «Коллатамп ИГ». Образцы губки готовили в соответствии с размерами

формируемого костного дефекта (8,0×4,0 мм и глубиной 4,0 мм). После введения клеток образцы заливали полной ростовой средой. Клетки культивировали на матрице в течение 5 сут (120 ч). Часть образцов использовали для оценки адгезии и жизнеспособности клеток методом флуоресцентной микроскопии через 48, 96 и 120 ч после введения в матрицу. Для визуализации клеток, адгезировавшихся на матрице, проводили прижизненное окрашивание ядер с применением флуорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen, США), обладающего высокой специфичностью к двухцепочечной молекуле ДНК (длина волны возбуждения — 377 нм, длина волны эмиссии — 447 нм; фотометр-имиджер Cytation 5 (BioTek, США)). Для маркировки живых клеток и характеристики их морфологии на материале использовали флуорохром кальцеин (Calcein AM; BD Pharmingen), окрашивающий цитоплазму только жизнеспособных клеток (длина волны возбуждения — 469 нм, длина волны эмиссии — 525 нм; многофункциональный фотометр-имиджер Cytation 5).

Через 48 ч после введения клеток образцы, предназначенные для эксперимента *in vivo*, трижды отмывали стерильным физиологическим раствором и передавали в операционную вивария для введения животным.

Гистологическое исследование. Забор материала для гистологического исследования проводили путем тщательного сепарирования мышц от костей, выделения сегментов костей длиной 1–1,5 см с областью костного регенерата. Костный материал фиксировали в 10% забуференном растворе формалина в течение трех суток, подвергали декальцинации в растворе «Трилон-В» (АО «Химреактив», Россия). Стандартную гистологическую проводку осуществляли на аппарате Excelsior ES (Thermo Fisher Scientific, США). После проводки изготавливали парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoStar (Thermo Fisher Scientific). Срезы толщиной 4–6 мкм получали на микротоме Microm HM 325 (Thermo Fisher Scientific), окрашивали их гематоксилином и эозином при помощи станции для окраски Gemini AS (Thermo Fisher Scientific). Микроскопическое исследование проводили на светооптическом микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems) при ×100, ×200.

Результаты

Характеристика клеточной культуры. Выделенные из жировой ткани кроликов клетки хорошо распластывались на пластике и приобретали характерную фибробластоподобную форму (рис. 3).

На протяжении всего периода наблюдения клетки культуры были морфологически однородными с выраженными отростками, четко очерченными ядрами. Клетки культур 3-го пассажа дифференцировались в остеогенном и адипогенном направлениях.

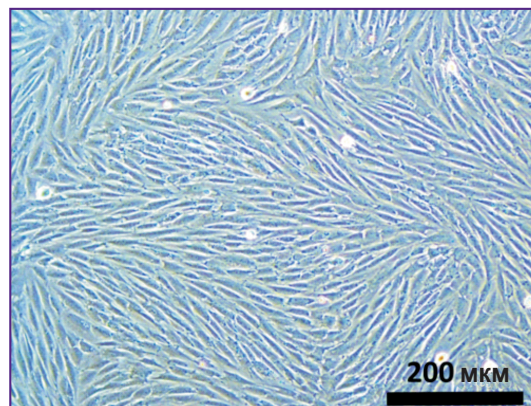


Рис. 3. МСК жировой ткани кролика перед введением в матрицу; 3-й пассаж; ×100

95% клеток, выделенных из жировой ткани кролика, на 3-м пассаже экспрессировали CD44, CD105 и не экспрессировали панлейкоцитарный антиген CD45. Таким образом, полученные клетки по своим характеристикам соответствовали критериям, определенным Международным обществом клеточной терапии для мезенхимальных стволовых клеток человека [23].

Взаимодействие МСК жировой ткани с ксеногенной коллагеновой матрицей. При культивировании на матрице «Коллатамп ИГ» через 48 ч с помощью флуоресцентной микроскопии отчетливо визуализировали овальные ядра клеток, окрашенные синим (рис. 4, а). Более длительное культивирование (96, 120 ч) приводило к увеличению плотности клеток (окрашенных ядер) в поле зрения (рис. 4, б).

Использование флуорохрома Calcein AM продемонстрировало большое количество живых распластанных клеток на поверхности матрицы «Коллатамп ИГ» через 24, 48, 120 ч культивирования (рис. 5).

Полученные нами данные по исследованию адгезии и жизнеспособности клеток на матрице «Коллатамп ИГ» в разные сроки после их введения в матрицу позволяют предполагать, что на образцах, подготовленных и использованных для эксперимента на животных через 48 ч после начала взаимодействия с матрицей, также сохранялись жизнеспособные и морфологически однородные МСК.

Клиническая картина. После хирургической санации динамика восстановления опороспособности проходила адекватно операционной травме, активно. Уже через 2–3 сут кролики были способны пользоваться оперированной конечностью. Раны заживали первичным натяжением. Швы снимали на 10–12-й дни. Рецидивов гнойно-воспалительного процесса и контрактур коленного сустава у животных не наблюдали.

Рентгенологическая картина. У кроликов контрольной группы, выведенных из эксперимента на 30-е и 60-е сутки, определяли дефект проксимального метаэпифиза незначительно меньших

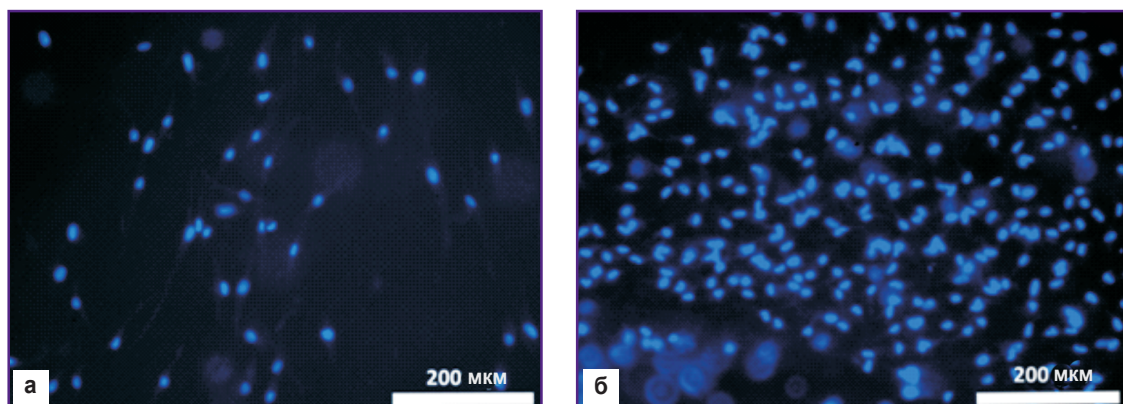


Рис. 4. Ядра МСК жировой ткани кролика на матрице «Коллатамп» ИГ:
а — 48 ч культивирования; *б* — 120 ч культивирования; флуоресцентная микроскопия; флуорохром Hoechst 33334; ×100

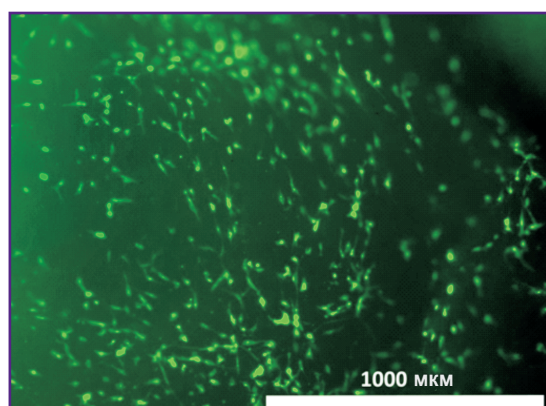


Рис. 5. МСК жировой ткани кролика на матрице «Коллатамп ИГ»;
 флуоресцентная микроскопия; флуорохром Calcein AM; 48 ч культивирования; ×40

размеров, чем при интраоперационном исследовании. Зона просветления (дефекта) была окружена каймой повышенной рентгенологической плотности. Данные изменения расценивали как результат реакции костной ткани на выполненную остеонекрэктомия и хронически протекавшее воспаление. Степень затемнения зоны дефекта (рентгенологическая плотность) изменилась незначительно, рентгенологическая тень была неоднородной. Отчетливой разницы в рентгенологической картине этих подгрупп не обнаружено (рис. 6).

У животных опытной группы через 30 сут эксперимента плотность рентгенологической тени незначительно превышала таковую в контрольной группе, границы дефекта становились умеренно размытыми (рис. 6, *а*), собственная тень дефекта была однородной. У животных, выведенных из эксперимента, через 60 сут плотность рентгенологической тени дефекта значительно возросла, границы стали более размытыми, отмечалась тенденция к уменьшению площади дефекта (рис. 6, *б*). Рентгенологическая

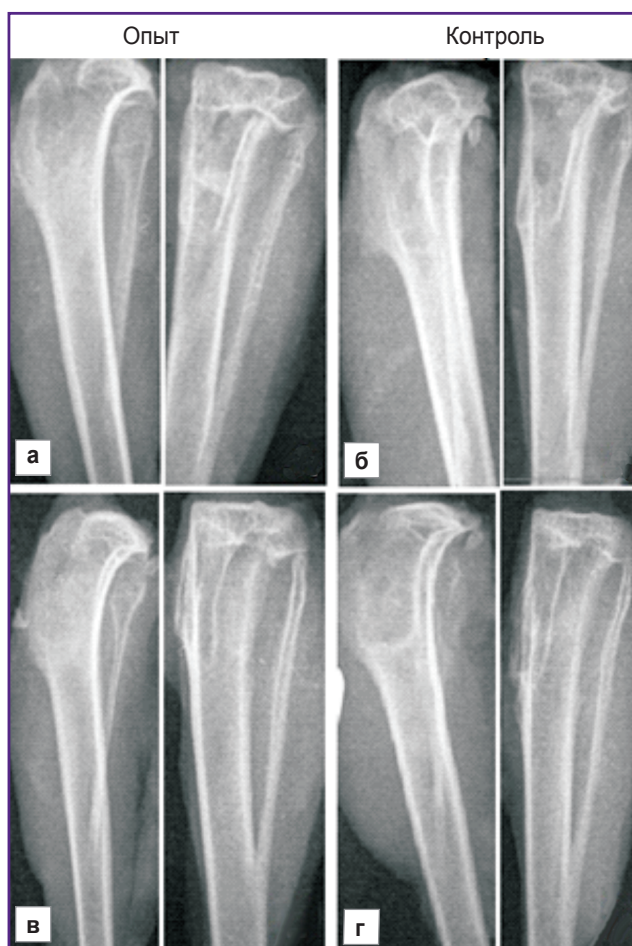


Рис. 6. Рентгенологическая картина области оперативного вмешательства:

а, в — через 30 и 60 сут после имплантации аутологических МСК на коллагеновой матрице; *б, г* — через 30 и 60 сут в группе контроля

тень дефекта продолжала оставаться равномерной и имела большую плотность, чем в контрольной группе. Подобные изменения свидетельствуют об активно

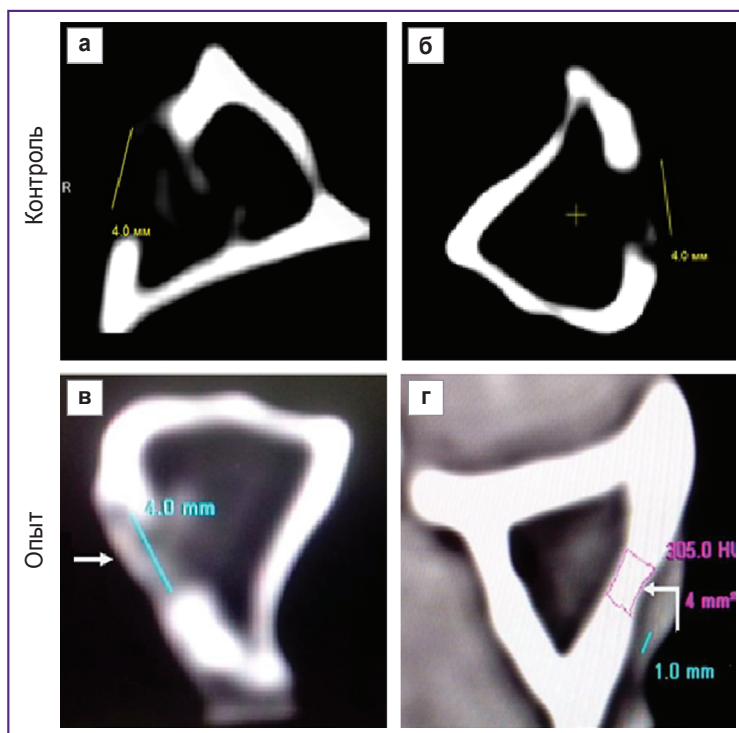


Рис. 7. КТ-картина области дефекта большеберцовой кости кроликов:

контрольная группа: а — интраоперационное исследование, область дефекта обозначена линией; б — после 60-дневного наблюдения животного, линией обозначена область не полностью восстановленного дефекта;

опытная группа: в — интраоперационное исследование, стрелкой обозначена область дефекта; г — после 60-дневного наблюдения, стрелкой обозначена область бывшего дефекта

протекающих процессах регенерации костной ткани в опытной группе по сравнению с контролем.

Компьютерно-томографическое исследование (КТ). Размеры дефекта, установленные при КТ-измерениях в день операции, соответствовали интраоперационным измерениям, выполненным штангенциркулем. При КТ-денситометрии этой области индекс Хаунсфилда после операции у всех кроликов контрольной группы составил 15–20 HU, что указывает на жидкостный характер содержимого полости. В смежных с дефектом кортикальных костных структурах индекс Хаунсфилда — 680–720 HU.

В динамике наблюдалось уменьшение размеров дефекта и увеличение средней плотности выполняющей его ткани от 184 до 224 HU.

На 30-е сутки после имплантации МСК наименьшая плотность ткани бывшего дефекта составляла от 63 до 94 HU. При выведении животных из эксперимента на 60-е сутки наименьший индекс Хаунсфилда бывшего дефекта составлял от 251 до 305 HU, что соответствует значению плотности костной ткани (рис. 7).

Таким образом, по данным рентгенографии, компьютерной томографии, включая КТ-денситометрию, наиболее активные процессы репаративной регенерации как кортикального дефекта, так и костной полости наблюдаются после применения аутологичных МСК. Подобные процессы описаны в других публикациях [24, 25], при этом результаты мало сопоставимы с нашими, поскольку методология проведения экспериментов размыта.

Гистологическое исследование. После пластики смоделированного дефекта гнойной раны у всех

животных к окончанию эксперимента область операционного дефекта была заполнена остеодной тканью различной степени зрелости, новообразованными костными балками. Признаки репаративного остеогенеза регистрировали в обеих группах животных. В опытной группе через 30 сут эксперимента область операционного дефекта была заполнена фрагментами имплантата с клетками, вплотную окруженными новообразованными костными балками, на поверхности которых наблюдалась пролиферация остеобластов (рис. 8, а), а через 60 сут — образование зрелой костной ткани (рис. 8, б). Проллиферация остеобластов на поверхности костных балок определялась и в контрольной группе, однако остеодную ткань различной степени зрелости чаще выявляли в опытной группе кроликов (35,0 против 20,0%). При использовании аутологичных МСК на коллагеновой матрице отмечено увеличение частоты встречаемости новообразованных костных балок: они регистрировались в 100% случаев (в группе с аутопластикой без МСК — в 70% случаев). Под влиянием аутологичных МСК на матрице произошло уменьшение фибрирования костного мозга (50,0 против 100,0% у кроликов только с аутопластикой) и образование хряща (рис. 8, в) (30,0 и 66,7% соответственно). Обращают на себя внимание особенности остеогенеза при использовании аутологичных МСК. Так, у животных экспериментальной группы по сравнению с животными контрольной группы новообразованные костные балки были более зрелыми и эффективнее заполняли область дефекта (100,0 против 60,0% соответственно) (см. рис. 8, б). Результаты гистологической картины

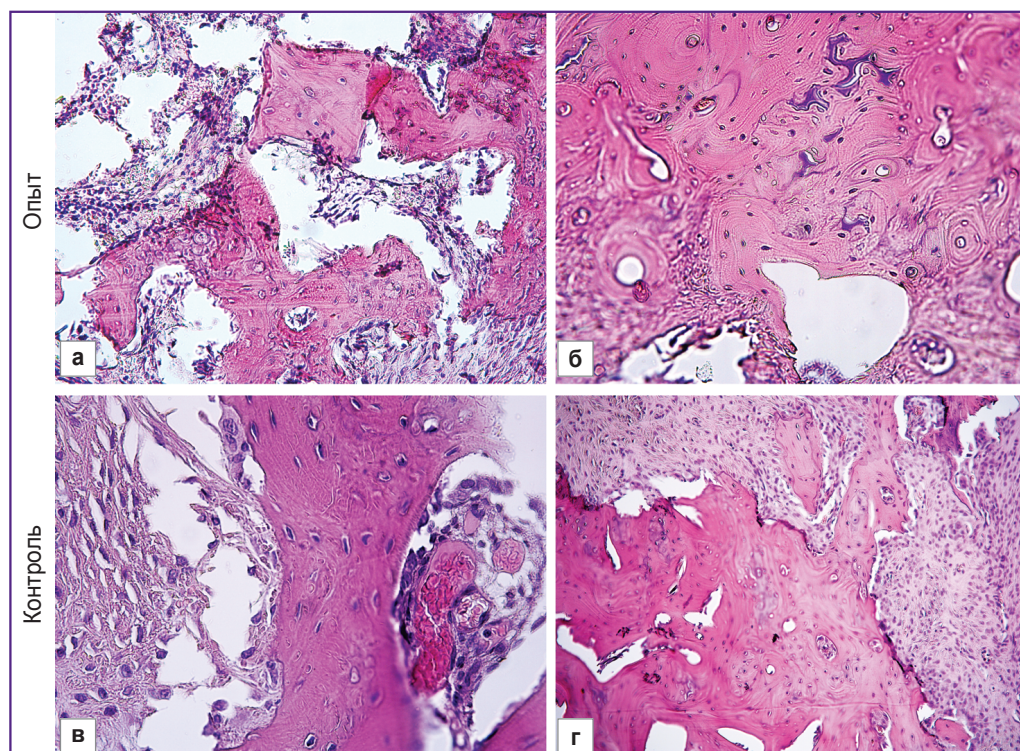


Рис. 8. Морфологические изменения костной ткани в опытной (а, б) и контрольной (в, г) группах через 30 и 60 сут после замещения костного дефекта; окраска гематоксилином и эозином; $\times 200$

по некоторым параметрам сопоставимы с таковыми в немногочисленных публикациях отечественных и зарубежных авторов, хотя ранее опубликованные работы относятся в большинстве своем к острым асептическим экспериментам [13, 16, 17, 24, 26].

Заключение

Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности использования коллагеновой матрицы с аутологичными мезенхимальными стромальными клетками в качестве пластического материала для восполнения костных дефектов, образующихся после некрэктомии очага хронического остеомиелита.

Применение мезенхимальных стромальных клеток на коллагеновой матрице способствует увеличению плотности заполнения костного дефекта; значительному ускорению образования костных балок по пути ремоделирования ткани вокруг матрицы с аутологичными клетками за счет наращивания ее объема вокруг имплантата; существенному снижению выраженности соединительнотканного компонента остеогенеза и хондрогенеза.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (№АААА-А18-118052190094-8).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Майбородин И.В., Шевела А.И., Морозов В.В., Михеева Т.В., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В., Майбородина В.И. Влияние экстрацеллюлярных везикул (экзосом) мезенхимальных стромальных клеток на регенерацию костной ткани. *Новости хирургии* 2019; 27(2): 196–203.
Maiborodin I.V., Shevela A.I., Morozov V.V., Mikheeva T.V., Figurenko N.F., Maslov R.V., Maiborodina V.I. The influence of extracellular vesicles (exosomes) of mesenchymal stromal cells on bone tissue regeneration. *Novosti khirurgii* 2019; 27(2): 196–203.
2. Лепехова С.А., Цяо Г., Гольдберг О.А., Тишков Н.В., Цяо Л., Курганский И.С., Иноземцев П.О., Федорова Л.И. Стимуляция репаративной регенерации опорной ткани в условиях отсроченного сопоставления отломков. *Сибирский научный медицинский журнал* 2019; 39(4): 85–92, <https://doi.org/10.15372/ssmj20190411>.
Lepekhova S.A., Qiao G., Goldberg O.A., Tishkov N.V., Qiao L., Kurganskiy I.S., Inozemtsev P.O., Fedorova L.I. Stimulation of reparative regeneration of supporting tissue under conditions of delayed apposition of fragments. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* 2019; 39(4): 85–92, <https://doi.org/10.15372/ssmj20190411>.
3. Медков М.А., Грищенко Д.Н., Климов М.А., Курявый В.Г., Апанасевич В.И. Кальций-фосфатные рентгеноконтрастные цементы для восстановления костной

- ткани. *Химическая технология* 2019; 20(5): 194–199.
- Medkov M.A., Grishchenko D.N., Klimov M.A., Kuryavyi V.G., Aranasevich V.I. Calcium-phosphate X-ray contrast cements for reconstruction of bone tissue. *Himicheskaya tehnologiya* 2019; 20(5): 194–199.
4. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., Мелашченко Е.С., Литвинова Л.С. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор. *Цитология* 2020; 62(5): 305–315.
- Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Norkin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Shunkin E.O., Todosenko N.M., Melashchenko E.S., Litvinova L.S. Cellular-molecular aspects of inflammation, angiogenesis and osteogenesis. A short review. *Tsitologiya* 2020; 62(5): 305–315.
5. Рубникович С.П., Кузьменко Е.В., Денисова Ю.Л., Андреева В.А. Эффективность применения стволовых клеток для регенерации костной ткани. В кн.: *Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации*. Витебск; 2020; с. 160–161.
- Rubnikovich S.P., Kuz'menko E.V., Denisova Yu.L., Andreeva V.A. Effektivnost' primeneniya stvolovykh kletok dlya regeneratsii kostnoy tkani. V kn.: *Dostizheniya fundamental'noy, klinicheskoy meditsiny i farmatsii* [The effectiveness of using stem cells for bone tissue regeneration. In: Achievements of fundamental, clinical medicine and pharmacy]. Vitebsk; 2020; p. 160–161.
6. Мурзич А.Э., Пашкевич Л.А., Жерносеченко А.А. Экспериментальное обоснование способа аутоотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток для регенерации костной ткани головки бедра. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук* 2020; 17(1): 7–19, <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-7-19>.
- Murzich A.E., Pashkevich L.A., Zhernasechanka N.A. Experimental justification of the method of mesenchymal stem cell autotransplantation for regeneration of the femoral head bone tissue. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk* 2020; 17(1): 7–19, <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-1-7-19>.
7. Гордиенко И.И., Цап Н.А., Борисов С.А., Валамина И.Е. Репарация костной ткани в зоне консолидации открытого перелома трубчатой кости лабораторного животного. Экспериментальное исследование. *Детская хирургия* 2020; 24(2): 96–100.
- Gordienko I.I., Tsap N.A., Borisov S.A., Valamina I.E. Reparation of bone tissue in the area of open fracture consolidation in tubular bone in laboratory animals. An experimental study. *Detskaa hirurgia* 2020; 24(2): 96–100.
8. Резник Л.Б., Стасенко И.В., Негров Д.А. Результаты применения различных видов имплантов при замещении остеомиелитических дефектов длинных костей в эксперименте. *Гений ортопедии* 2016; 4: 81–87.
- Reznik L.B., Stasenko I.V., Negrov D.A. Results of using various types of implants in experimental management of long bone osteomyelitic defects. *Genij ortopedii* 2016; 4: 81–87.
9. Кривенко С.Н., Попов С.В. Особенности металло-остеосинтеза при замещении костных дефектов у больных с травматическим остеомиелитом длинных костей. *Вестник неотложной и восстановительной хирургии* 2020; 5(2): 138–145.
- Krivenko S.N., Popov S.V. Replacement of osteal defects at the patients with a traumatic osteomyelitis of long bones. *Vestnik neotloznoj i vosstanovitel'noy hirurgii* 2020; 5(2): 138–145.
10. Гараев М.Р., Пантелеев В.С., Нартайлаков М.А., Дорофеев В.Д., Инюшев Д.В., Голков Д.С. Хирургическое лечение хронического остеомиелита. *Креативная хирургия и онкология* 2019; 9(3): 209–215, <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2019-9-3-209-215>.
- Garaev M.R., Panteleev V.S., Nartaylakov M.A., Dorofeev V.D., Inyushev D.V., Golkov D.S. Surgical treatment of chronic osteomyelitis. *Kreativnaa hirurgia i onkologiya* 2019; 9(3): 209–215, <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2019-9-3-209-215>.
11. De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A., Alfonso Z., Zuk P.A., Zhu M., Dragoo J.L., Ashjian P., Thomas B., Benhaim P., Chen I., Fraser J., Hedrick M.H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174(3): 101–109, <https://doi.org/10.1159/000071150>.
12. Im G.I., Shin Y.W., Lee K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13(10): 845–853, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.05.005>.
13. Hayashi O., Katsube Y., Hirose M., Ohgushi H., Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008; 82(3): 238–247, <https://doi.org/10.1007/s00223-008-9112-y>.
14. Lendeckel S., Jödicke A., Christophis P., Heindinger K., Wolff J., Fraser J.K., Hedrick M.H., Berthold L., Howaldt H.P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 2004; 32(6): 370–373, <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2004.06.002>.
15. Mesimäki K., Lindroos B., Törnwall J., Mauno J., Lindqvist C., Kontio R., Miettinen S., Suuronen R. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38(3): 201–209, <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2009.01.001>.
16. Corsetti A., Bahuschewskij C., Ponzoni D., Langie R., dos Santos L.A., Camassola M., Nardi N.B., Puricelli E. Repair of bone defects using adipose-derived stem cells combined with alpha-tricalcium phosphate and gelatin sponge scaffolds in a rat model. *J Appl Oral Sci* 2017; 25(1): 10–19, <https://doi.org/10.1590/1678-77572016-0094>.
17. Arrigoni E., de Gerolamo L., Di Giancamillo A., Stanco D., Dellavia C., Carnelli D., Campagnol M., Domeneghini C., Brini A.T. Adipose-derived stem cells and rabbit bone regeneration: histomorphometric, immunohistochemical and mechanical characterization. *J Orthop Sci* 2013; 18(2): 331–339, <https://doi.org/10.1007/s00776-012-0349-y>.
18. Fang B., Liu Y., Zheng D., Shan S., Wang C., Gao Y., Wang J., Xie Y., Zhang Y., Li Q. The effects of mechanical stretch on the biological characteristics of human adipose-derived stem cells. *J Cell Mol Med* 2019; 23(6): 4244–4255, <https://doi.org/10.1111/jcmm.14314>.
19. Живцов О.П., Алейник Д.Я., Орлинская Н.Ю., Митрофанов В.Н. Особенности регенерации костной ткани в условиях применения клеточно-инженерной конструкции для восстановления костного дефекта у кролика. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований* 2019; 11: 54–59, <https://doi.org/10.17513/mjpf.12931>.
- Zhivtsov O.P., Aleynik D.Ya., Orlinskaya N.Yu.,

Mitrofanov V.N. Peculiarities of bone tissue regeneration in conditions of a cell engineering construction for restoring bone defect in a rabbit. *Mezhdunarodnyj zurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij* 2019; 11: 54–59, <https://doi.org/10.17513/mjpf.12931>.

20. Резник Л.Б., Борзунов Д.Ю., Моховиков Д.С., Стасенко И.В. Опыт замещения дефектов длинных костей на основе сочетанного применения внеочагового чрескостного остеосинтеза и остеокондуктивных материалов в клинической практике. *Политравма* 2017; 2: 16–22.

Reznik L.B., Borzunov D.Yu., Moxhnikov D.S., Stasenko I.V. Experience with long bones defects replacement on the basis of combined use of transosseous osteosynthesis and osteoconductive materials in clinical practice. *Politravma* 2017; 2: 16–22.

21. Глухов А.А., Андреев А.А., Малкина Н.А. Ультразвуковая обработка и применение коллагена в лечении экспериментального хронического остеомиелита. *Хирургия. Приложение к журналу Consilium Medicum* 2017; 1: 62–70.

Glukhov A.A., Andreev A.A., Malkina N.A. Ultrasonic treatment and application of collagen in the treatment of experimental chronic osteomyelitis. *Khirurgiya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum* 2017; 1: 62–70.

22. Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н., Сидорова Т.И. Исследование нового костно-замещающего препарата на модели in vitro. *Технологии живых систем* 2013; 10(8): 38–42.

Aleynik D.Y., Charykova I.N., Sidorova T.I. Investigation

of a new bone replacement material on the in vitro model. *Tekhnologii zhivyykh sistem* 2013; 10(8): 38–42.

23. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–317, <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

24. Seebach E., Holschbach J., Buchta N., Bitsch R.G., Kleinschmidt K., Richter W. Mesenchymal stromal cell implantation for stimulation of long bone healing aggravates *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis. *Acta Biomater* 2015; 21: 165–177, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.019>.

25. Yoshitani J., Kabata T., Arakawa H., Kato Y., Nojima T., Hayashi K., Tokoro M., Sugimoto N., Kajino Y., Inoue D., Ueoka K., Yamamuro Y., Tsuchiya H. Combinational therapy with antibiotics and antibiotic-loaded adipose-derived stem cells reduce abscess formation in implant-related infection in rats. *Sci Rep* 2020; 10(1): 11182, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68184-y>.

26. Wagner J.M., Reinkemeier F., Wallner C., Dadras M., Huber J., Schmidt S.V., Drysch M., Dittfeld S., Jaurich H., Becerikli M., Becker K., Rauch N., Duhan V., Lehnhardt M., Behr B. Adipose-derived stromal cells are capable of restoring bone regeneration after post-traumatic osteomyelitis and modulate B-cell response. *Stem Cells Transl Med* 2019; 8(10): 1084–1091, <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0266>.