



Влияние противовоспалительных препаратов на регенерацию костной ткани при трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

**А.В. Волков^{1,2}, Е.Н. Антонов³, А.В. Васильев^{1,4}, Т.Б. Бухарова⁴,
Г.К. Эшмотова¹, В.К. Попов³, Е.Б. Вихрова⁴, С.А. Минаева³,
Г.Д. Капанадзе⁵, Н.Л. Фатхудинова¹, А.О. Ревякин⁵, Д.В. Гольдштейн⁴**

¹ – ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва

² – ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава РФ, Москва

³ – ФГБУН «Институт проблем лазерных и информационных технологий» РАН, Москва

⁴ – ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва

⁵ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: к.б.н. Бухарова Татьяна Борисовна, bukharova_rmt@yandex.ru, +7(499)6128604

Разработаны тканеинженерные конструкции для регенерации костной ткани на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани и полилактогликолидных носителей, содержащих противовоспалительный препарат Ибупрофен. Для включения Ибупрофена в состав материала использованы сверхкритические флюидные технологии. При аллогенной трансплантации полученных конструкций в зону дефекта бедренных костей крыс наблюдается снижение иммунного ответа по сравнению с контрольной группой (без Ибупрофена). В опытной группе регенерация костной ткани происходит по пути прямого остеогенеза без промежуточного формирования хряща, что приводит к снижению сроков репарации.

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, аллогенная трансплантация, СКФ- инкапсуляция, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, репаративный остеогенез, противовоспалительные препараты.

Введение

Тканевая инженерия – современное направление регенеративной медицины, целью которого является создание живых эквивалентов тканей на основе клеточных культур и матриц-носителей

для обеспечения органотипической регенерации поврежденных тканей. Выбор источника получения клеточных культур обусловлен клинической задачей и предполагает использование как аутологичных, так и донорских клеток.

Преимуществами аллогенных трансплантаций являются отсутствие необходимости длительного процессинга культур, практически неограниченный объем материала, отсутствие риска потери индивидуального трансплантата. Кроме того, на аллогенном материале могут быть реализованы подходы генетической модификации клеток для получения продуцентов белковых молекул с терапевтическим эффектом. Существенным ограничением использования аллогенного клеточного материала является низкая иммунная совместимость донорского трансплантата и организма реципиента. Традиционные способы снижения иммунной реакции, основанные на применении глюкокортикоидов природного или синтетического происхождения, таких как Преднизолон, Дексаметазон, могут приводить к искажению процессов цитодифференцировки клеточной культуры и, как следствие, снижению эффективности клеточной трансплантации [1, 4]. Поиск альтернативных подходов основан на исследовании влияния микроокружения трансплантированных клеток. Было показано, что ключевую роль в иммунном ответе при трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга играют интерферон- γ и фактор некроза опухоли- α , секретируемые Т-хелперными клетками. Синергичное действие этих факторов приводит, во-первых, к переключению сигнальных путей ММСК и блокирует их дифференцировку в остеогенном направлении, а во-вторых, запускает апоптоз [7]. Введение ацетилсалициловой кислоты как специфического блокатора воспалительных реакций приводит к снижению концентрации этих факторов и существенному

усилению регенерации в зоне костного дефекта. Однако известно, что применение ацетилсалициловой кислоты ингибирует пролиферацию ММСК [8], а также может приводить к агранулоцитозу. В настоящей работе в качестве эффективной замены ацетилсалициловой кислоты выбран другой нестероидный противовоспалительный препарат – Ибупрофен, который также снижает иммунный ответ при аллогенной трансплантации, ингибируя синтез простагландинов, но его действие, в отличие от аспирина, является обратимым.

Для обеспечения локального действия Ибупрофена в области трансплантации он был инкапсулирован в пористую матрицу-носитель, изготовленную из полилактогликолида – сополимера молочной и гликолевой кислот, с помощью сверхкритической флюидной (СКФ) технологии [3]. Постепенное диффузионное высвобождение препарата из полимерной матрицы в окружающие ткани по мере ее биорезорбции обеспечивает пролонгированное действие Ибупрофена. Поиск оптимальных режимов инкапсуляции Ибупрофена в полимерные матрицы является весьма актуальной и самостоятельной задачей [6]. При этом *in vivo* исследование эффективности применения тканеинженерных конструкций на основе этих материалов ранее не проводилось.

Целью работы явилось исследование процесса регенерации костной ткани при трансплантации тканеинженерной конструкции на основе аллогенных ММСК жировой ткани, дифференцированных в остеогенном направлении, и пористых матриц-носителей из полилактогликолида, содержащих Ибупрофен, на модели костного дефекта у крыс.

Материалы и методы

Получение культуры остеогенных клеток

Для получения культуры ММСК у крыс забирали фрагмент жировой ткани и дезагрегировали его путем ферментной обработки смесью коллагеназы I типа (0,5 мг/мл) и диспазы (1 мг/мл). Клетки культивировали в ростовой среде DMEM/F12 (ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА), 100 мг/л Амикацина (Синтез).

Для остеогенной дифференцировки клетки на 2-3 пассаже наращивали до 70% монослоя и инкубировали в индуктивной среде DMEM (ПанЭко) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл Амикацина, 50 мг/л L-аскорбиновой кислоты (Sigma), 10 мМ/л β -глицерофосфата натрия (Sigma) и 10 нМ 1,25-дигидроксивитамина D3 (Roshe).

Для оценки эффективности остеогенной дифференцировки проводили окрашивание очагов минерализации ализариновым красным. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом, pH 7,2-7,4 и окрашивали 2% раствором ализаринового красного, pH 4,1-4,2 («ПанЭко»).

Получение полимерных матриц-носителей с Ибупрофеном

Для изготовления трехмерных пористых матриц использовали биорезорбируемый полилактогликолид марки Purasorb PDLG 7507 (приведенная вязкость 0,4 дл/г, производство «Puras Biochem», Нидерланды). Инкапсуляцию нестероидного противовоспалительного препарата Ибупрофен («ЗВ Pharmachem International Co.», КНР) в полилактогликолид и формирование из него биоактивных матричных структур производили в среде сверхкритического CO₂ с помощью установки для СКФ монолитиза-

ции полимерных порошков [3]. Гранулы полилактогликолида измельчали в ротационной мельнице и с помощью сита отбирали фракцию с дисперсностью 100÷200 мкм. К порошку полимера добавляли порошок Ибупрофена в пропорции 20 масс.%, смесь перемешивали и помещали в ячейки пресс-форм, изготовленные из политетрафторэтилена (Тефлон™). Пресс-формы помещали в камеру высокого давления, которую уплотняли, продували и заполняли диоксидом углерода при комнатной температуре до давления 5 МПа. После этого включали нагреватель, и по мере достижения температуры 40°C давление CO₂ доводили до 10 МПа. Систему выдерживали в этих условиях в течение 1 ч. Затем производили постепенный (в течение 15 мин) сброс давления до атмосферного значения. После последующей выдержки полученного материала в атмосферных условиях в течение 24 ч (необходимой для полного удаления CO₂ из композита и его окончательного отверждения) матрицы извлекали из пресс-формы.

Изготовление тканеинженерных конструкций

Сборку конструкций осуществляли путем размещения клеток на полимерной матрице с помощью фибринового сгустка по методике, разработанной нами ранее [2]. Предварительно у крыс забирали кровь и с помощью центрифугирования получали плазму крови, обогащенную тромбоцитами (PRP - Platelet Rich Plasma). Дифференцированные в остеогенном направлении ММСК снимали с культурального пластика, осаждали и ресуспензировали в PRP. Полученную суспензию наносили на матрицу и добавляли бычий тромбин, растворенный в 10% р-ре хлорида каль-

ция. Полимеризация фибрина происходила в течение 5-7 мин.

Трансплантация ТИК крысам

Исследование выполняли на самцах белых аутбредных крыс начальной массой 300 ± 10 г, с моделью щелевидного дефекта большеберцовых костей. Животным трансплантировали тканеинженерные конструкции, содержащие Ибупрофен (опытная группа) и без Ибупрофена (контрольная группа). Операции проводили под общим наркозом (Zoletil, 0,06 мл/кг). Производили продольный разрез кожи в проекции большеберцовой кости, последовательно тупым и острым путем обнажали большеберцовую кость. Посередине её фронтальной поверхности колесовидным бором с проточным охлаждением физиологическим р-ром формировали отверстие 12×1 мм до костного мозга. В рану вносили заранее подготовленную тканеинженерную конструкцию, заполняя весь объём дефекта кости. Рану послойно ушивали. Животных выводили из эксперимента на 10 и 30 сутки путем передозировки эфирного наркоза. Забирали нужную область большеберцовой кости и помещали в 10% формалин.

Гистологическая обработка

Образцы подвергали декальцинации в смеси 4% р-ров муравьиной и соляной кислот. Гистологическую проводку осуществляли по спиртам восходящей концентрации, ксилолу и заливали в парафин. Из блоков изготавливали полусерийные срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином.

Результаты исследований

Матрицы-носители

Изготовленные с помощью сверхкритического диоксида углерода образцы представляли собой пористые цилиндры диаметром 5 мм и высотой 4 мм, с распределенным внутри их объема Ибупрофеном. Фотографии образцов биоактивных матриц и их микроструктура представлены на рис. 1. Пористость матриц составляла порядка 40% и определялась исходной плотностью заполнения ячеек пресс-формы смесью порошков полимера и Ибупрофена.

Использованный для формирования матриц сополимер молочной и гликолевой кислот PDLG 7507 имеет молекулярную массу в диапазоне 80-100 кДа, время его биорезорбции в тканях, согласно данным производителя, составляет порядка

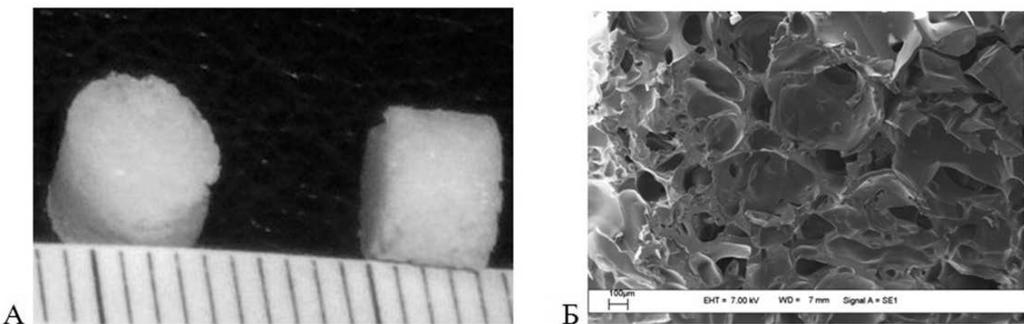


Рис. 1. Образцы биоактивных матриц с Ибупрофеном. А – внешний вид образцов; Б – сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) их поверхности. Деление шкалы – 1 мм (А) и 100 мкм (Б).

5-6 мес., что является достаточным сроком для формирования новой костной ткани в области дефекта. СКФ инкапсуляция Ибупрофена и создание на его основе биорезорбируемого полимерного композита позволяет стабилизировать препарат для длительного хранения лекарственной субстанции и обеспечить контролируемую кинетику его выхода вещества в окружающие ткани.

Гистологическое исследование

Контрольная группа, 10 суток

При гистологическом исследовании образцов контрольной группы (без Ибупрофена) через 10 дней после трансплантации наблюдается аппозиционный рост ретикулофиброзной костной ткани от материнской кости к центру дефекта. В центре костной раны располагается первичная костная мозоль, состоящая преимущественно из соединительной ткани с очагами хондроиды и островками ретикулофиброзной костной ткани. В окружающих тканях умеренно выраженная лимфо- и плазмоцитарная инфильтрация. Наблюдаются очаги грануляционной ткани. Костный мозг реактивно изменен, полнокровен. Субнадкостничный стабилизационный остеогенез преобладает над репаративным. Матрица-носитель в ряде случаев фрагментирована и располагается вне зоны регенерации.

Опытная группа, 10 суток

Спустя 10 суток после трансплантации тканеинженерной конструкции, содержащей Ибупрофен, в области костной раны выявляются, главным образом, формирующиеся балки новообразованной костной ткани, которые проходят сквозь матрицу-носитель, оттесняя его в костномозговой канал и кнаружи в мягкие ткани. В порах матрицы-носителя выявляется васкуляризованная соединительная ткань с островками остеогенеза.

Контрольная группа, 30 суток

При гистологическом исследовании образцов контрольной группы спустя 30 суток после трансплантации костный регенерат содержит значительное количество очагов хондроиды и гиалинового хряща (рис. 2). Костные балки не организованы, между ними выявляются прослойки соединительной ткани с грубыми волокнами. В окружающих тканях лимфо- и плазмоцитарная инфильтрация не обнаруживается. Матрица-носитель в ряде случаев фрагментирована и располагается вне зоны регенерации. В некоторых местах матрица-носитель располагается внутрикостно и окружена соединительной тканью с инфильтрацией лимфоцитами.

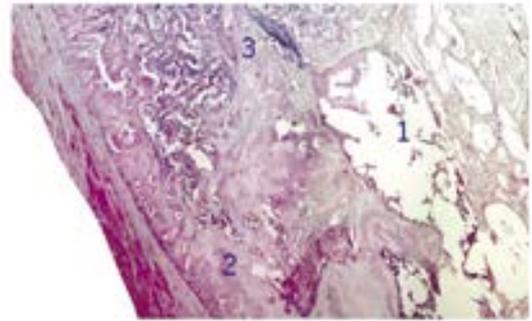


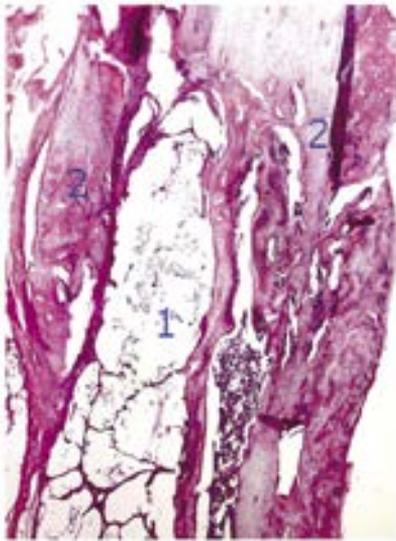
Рис. 2. Гистологическая картина костного регенерата бедренной кости крысы через 30 суток после трансплантации тканеинженерной конструкции без Ибупрофена. Костная рана преимущественно заполняется организуемым созревающим костным матриксом в сочетании с хондроидом, гранулы материала не визуализируются. 1 – материал; 2 – пластинчатая костная ткань диафиза; 3 – хондроид. Окрашивание гематоксилином и эозином, х32.

Таким образом, при внутрикостной трансплантации тканеинженерной конструкции, содержащей аллогенные клетки на матрице-носителе из полилактогликолида, регенерация костной

ткани осуществляется типичным вариантом течения регенераторного процесса – энхондральным остеогенезом, отличительной особенностью которого является наличие лимфоцитарной инфильтрации вокруг ТИК.

Опытная группа, 30 суток

Гистологическая картина через 30 дней после трансплантации тканеинженерной конструкции, содержащей Ибупрофен, соответствовала завершению процессов регенерации с компактизацией костного матрикса кортикального слоя вокруг матрицы носителя, реорганизацией вторичной костной мозоли, начальными признаками восстановления проходимости костномозгового канала



(рис. 3).

Рис. 3. Гистологическая картина костного регенерата бедренной кости крысы через 30 суток после трансплантации тканеинженерной конструкции, в матрицу-носитель которой инкапсулирован Ибупрофен. Костная рана преимущественно заполнена организуемым созревающим костным матриксом, гранулы материала не визуализируются. 1 – материал, 2 – пластинчатая костная ткань диафиза кости. Окрашивание гематоксили-

ном и эозином, х32.

Обсуждение результатов

Формирование однородно наполненных композитных структур из порошковых материалов, содержащих высокомолекулярные вещества, включая биологически активные соединения, является достаточно сложной научнотехнической задачей. Использование механического перемешивания и последующего плавления исходных компонентов для получения таких биоматериалов имеет существенные ограничения, поскольку может приводить к потере их биоактивности и частичной деструкции полимера с образованием токсичных составляющих. Матрицы, изготовленные с использованием органических растворителей, также могут содержать следы токсичных веществ. Используемый нами для формирования пористых полимерных матриц, содержащих Ибупрофен, процесс СКФ монолитизации не имеет указанных недостатков. Процесс может проводиться при температурах 35–40°C и без использования каких-либо токсичных компонентов. Биологическая активность препаратов при этом полностью сохраняется. В настоящее время этот метод является одним из наиболее перспективных способов формирования пористых матриц для тканевой инженерии из полимерных материалов [5].

Экспериментальное исследование трансплантации тканеинженерной конструкции, содержащей аллогенные ММСЖ жировой ткани, дифференцированные в остеогенном направлении и матрицу-носитель, содержащую Ибупрофен в качестве противовоспалительного агента, продемонстрировало особенности течения регенеративного процесса в костной ране большеберцо-

вой кости у крыс. Кардинальная разница в течение процессов регенерации была заметна уже на ранних сроках. Так, на 10 сутки в группе без Ибупрофена костный регенерат представлял собой типичную первичную костную мозоль с характерными признаками энхондрального остеогенеза – недифференцированной соединительной тканью, хондроидом на разных стадиях созревания и ретикулофиброзной костной тканью. Напротив, иная картина развивалась в костной ране, где присутствовал Ибупрофен. Течение репаративного остеогенеза шло по сценарию первичного остеогенеза без формирования недифференцированной соединительной ткани, хондроида. Кроме того, в клетчатке, окружающей регенерат, количество плазмо- и лимфоцитарных клеток было различным. Так, без Ибупрофена отмечалась вполне значимая реакция макроорганизма против аллогенной клеточной культуры, которая выражалась в диффузной инфильтрации малых лимфоцитов и плазматических клеток, тогда как в группе с Ибупрофеном подобных явлений обнаружено не было.

Однако лимфоидной реакции со стороны реципиента на срок 30 дней – как в контрольной, так и опытной группе – обнаружено не было, что согласуется с течением иммунологических реакций на введение антигенов. Наблюдались различия в структуре костных регенератов на этом сроке. В группе сравнения (матрица-носитель без Ибупрофена) процессы формирования и созревания первичной (провизорной) костной мозоли до конца не завершились, что выражалось в сохранении как очагов хондроида, так и бесструктурного костного матрикса. Таким образом, течение про-

цессов регенерации было вполне типичным для указанного срока. Однако в опытной группе (матрица-носитель с Ибупрофеном) фактически обнаруживались признаки реорганизации вторичной (остеоидной) костной мозоли.

Таким образом, нами обнаружена значительная разница течения регенеративного процесса в костной ране при трансплантации тканеинженерной конструкции с включением и без включения в матрицу-носитель противовоспалительного агента – нестероидного противовоспалительно средства Ибупрофен. С нашей точки зрения, налицо непосредственное влияние НПВС на ранние процессы формирования первичной костной мозоли при трансплантации аллогенных клеток-предшественников костной ткани, последующие за альтерацией, что выражается в различных механизмах остеогенеза и явных признаках снижения сроков репарации костной раны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 8309 от 24.08.2012 г.) и Правительства Российской Федерации (контракт № 14.В25.31.0019).

Список литературы

1. *Арутюнян И.В., Ржанинова А.А., Волков А.В., Гольдштейн Д.В.* Влияние дексаметазона на дифференцировку мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. № 2. С. 67-72.
2. *Бухарова Т.Б., Арутюнян И.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Федюнина И.А., Логовская Л.В., Волков А.В., Ржанинова А.А., Григорьян А.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В.* Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток

- жировой ткани и материала «Остеоматрикс» для регенерации костной ткани // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 3. С. 167-173.
3. **Попов В.К., Краснов А.П., Воложин А.И., Хоудл С.М.** Новые биоактивные композиты для регенерации костных тканей // Перспективные Материалы. 2004. № 4. С. 49-57.
 4. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль 2С. 2010. С. 88-101.
 5. **Barry J.J.A., Silva M., Popov V.K., Shakesheff K.M., Howdle S.M.** Supercritical carbon dioxide: putting the fizz into biomaterials. *Philosophical Transactions of Royal Society A*. 2006. 364. 249-262.
 6. **Cardea S., Baldino L., Scognamiglio M., Reverchon E.** 3D PLLA/Ibuprofen composite scaffolds obtained by a supercritical fluids assisted process. *J. Mater Sci Mater Med*. 2014 Apr; 25(4): 989-98.
 7. **Liu Y., Wang L., Kikuri T., Akiyama K., Chen C., Xu X., Yang R., Chen W., Wang S., Shi S.** Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nat Med*. 2011 Nov 20; 17(12):1594-601.
 8. **Wang Y., Chen X., Zhu W., Zhang H., Hu S., Cong X.** Growth inhibition of mesenchymal stem cells by aspirin: involvement of the WNT/

beta-catenin signal pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2006 Aug; 33(8):696-701.

Effect of anti-inflammatory drugs on bone regeneration by transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells

A.V. Volkov, E.N. Antonov, A.V. Vasilev, T.B. Bukharova, G.K. Eshmotova, V.K. Popov, E.B. Vikhrova, S.A. Minaeva, G.D. Kapanadze, N.L. Fatkhudinova, A.O. Revyakin, D.V. Goldshteyn

Tissue engineering construction (TEC) for regeneration of a bone tissue on basis multipotent mesenchymal stem cells of fatty tissue and polylactic-glycolic carriers containing the anti-inflammatory drug Ibuprofen are developed. For inclusion of the Ibuprofen in composition of material supercritical fluid technologies are used. At allogenny transplantation of the received designs in a zone of defect of femurs of rats decrease in the immune answer in comparison with control group is observed (without Ibuprofen). In experimental group regeneration of a bone tissue happens on the way of direct osteogenesis without intermediate formation of a cartilage that leads to decrease in terms of a reparation process.

Key words: tissue engineering construction, allogeneic transplantation, SKF encapsulation, multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, reparative osteogenesis, anti-inflammatory drugs.