



Научно-исследовательский институт
травматологии и ортопедии

Травматология және ортопедия

Научно-практический журнал
Казахстанской ассоциации травматологов-ортопедов

Номер 2 (52) 2020

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ДЕНСАУЛЫҚ САҚТАУ МИНИСТРЛІГІ
ТРАВМАТОЛОГИЯ ЖӘНЕ ОРТОПЕДИЯ ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ



ТРАВМАТОГИЯ ЖӘНЕ ОРТОПЕДИЯ

ҒЫЛЫМИ-ТӘЖІРИБЕЛІК ЖУРНАЛ

Журналда жарияланған материалдардың академиялық адалдық саясатына сай болуына авторлар жауапты. Редакцияның ресми рұқсатынсыз журналда жарияланған қолжазбаларды қайта басып шығаруға, кез-келген формада, оның ішінде электронды бұқаралық ақпарат құралдарында қолдануға тыйым салынады.

Нұр-Сұлтан, 2020

<https://doi.org/10.52889/1684-9280-2020-2-52-18-23>

УДК 616.728.3: 616.72-007.248

МРНТИ: 76.29.41

Оригинальная статья

Лечение дегенеративно-дистрофических заболеваний коленного сустава на основе использования мезенхимальных стволовых клеток синовиальной оболочки

Батпенов Н.Д.¹, Раймагамбетов Е.К.², Корганбекова Г.С.³, Сарсенова М.А.⁴,
Исабекова А.С.⁵, Жунусова М.С.⁶, Огай В.Б.⁷

¹ Директор Научно-исследовательского института травматологии и ортопедии, Нур-Султан, Казахстан.
E-mail: niitokz@med.mail.kz

² Заведующий отделением ортопедии № 5, Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии,
Нур-Султан, Казахстан. E-mail: raimagambetov_e@niito.kz

³ Врач-ординатор отделения ортопедии № 5, Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии,
Нур-Султан, Казахстан. E-mail: gsk28@mail.ru

⁴ Научный сотрудник Национального центра биотехнологий, Нур-Султан, Казахстан. Email: info@biocenter.kz

⁵ Старший научный сотрудник Национального центра биотехнологий, Нур-Султан, Казахстан.
Email: info@biocenter.kz

⁶ Младший научный сотрудник Национального центра биотехнологий, Нур-Султан, Казахстан.
Email: info@biocenter.kz

⁷ Заведующий лабораторией стволовых клеток Национального центра биотехнологий, Нур-Султан, Казахстан.
Email: info@biocenter.kz

Резюме

С использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток успешно пролечено 12 пациентов с патологией хряща коленного сустава. На первом этапе всем пациентам выполнен традиционный артроскопический дебридмент коленного сустава, во время которого был выполнен забор образца синовиальной оболочки, после чего образец передавался в Национальный центр биотехнологий для культивирования мезенхимальных стволовых клеток. После культивирования терапевтически эффективного количества клеток, материал пункционно вводился в полость пораженного сустава. Оценка результатов продемонстрировала положительное влияние метода на течение заболевания.

Ключевые слова: дегенеративно-дистрофические заболевания коленного сустава, клеточные технологии, мезенхимальные стволовые клетки.

Травматология және ортопедия; 2020; 2 (52): 18-23

Поступила в редакцию: 12-03-2020

Принята к печати: 05-04-2020



Эта работа лицензируется в соответствии с международной лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Corresponding author: Yerik Raimagambetov, Head of the Department of Orthopedics No. 5, Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Postal code: 010000

Address: Kazakhstan, Nur-Sultan, Abylai Khan Avenue, 15A

Phone: +7 701 999 2259

E-mail: raimagambetov_e@niito.kz

ВВЕДЕНИЕ

Остеоартроз коленных суставов одна из причин инвалидизации трудоспособного населения [1]. Причиной заболевания может быть инфекция, реактивная иммунная реакция, травмы и микротравмы, физические перегрузки, гормонально-метаболические нарушения, гиподинамия, которые вызывают разрушения суставного хряща и субхондральной кости. Остеоартрозом страдают около 0,8-1% всего населения земного шара. Отсутствие кровеносных сосудов в суставе дает возможность регенерации лишь небольших дефектов гиалинового хряща или повреждений в костно-хрящевой ткани с иммобилизацией стволовых клеток из костного мозга. Однако при естественной регенерации образуется фиброзная ткань, которая по архитектонике, механическим свойствам отличается от гиалинового хряща сустава [2]. Современными методами лечения остеохондральных дефектов является микроперфорация суставной поверхности и микропереломы, которые направлены на стимуляцию миграции собственных стволовых клеток [3]. Клеточная терапия на основе трансплантации аутологичных хондроцитов или мезенхимальных стволовых клеток позволяет восстановить хрящевые дефекты, но неглубокие остеохондральные повреждения [4]. Для восстановления глубоких остеохондральных дефектов разрабатываются

сложные методы регенерации на основе тканевой инженерии с применением стволовых клеток, ростовых факторов, биodeградируемых и биосовместимых скаффолдов [5].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) синовиальной оболочки отличаются относительной простотой выделения и культивирования, способностью пролиферировать в течение длительного времени *in vitro* и обладают мощным стволовым потенциалом. Также было показано, что МСК синовиальной оболочки способны продуцировать проангиогенные факторы роста, тем самым стимулируя ангиогенез и ускоряя процесс восстановления поврежденной костной ткани. Более того, было обнаружено, что количество МСК синовиальной оболочки и их регенераторная способность остается неизменно независимой от возраста человека [6].

Цель исследования заключается в получении мезенхимальных стволовых клеток синовиальной оболочки, оценке их терапевтической эффективности в клинических исследованиях лечения остеоартроза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе были использованы методы клеточной биотехнологии, органической химии и иммуноцитохимии, клинические данные, рентгенография, магнитно-резонансная томография.

Забор синовиальной оболочки выполнялся в процессе артроскопических процедур. В условиях Национального центра биотехнологии культивировали МСК. Контроль качества проводился с использованием следующих методов на:

- определение количества и жизнеспособности клеток;
- фенотипический анализ культивированных клеток;
- тест на бактериальную контаминацию;
- тест на определение микоплазмы в культивированных клетках;
- тест на эндотоксины;
- тест на стерильность питательных сред и ростовых добавок.

После успешного прохождения тестирования к выпускаемой продукции прилагался сертификат качества.

При приготовлении готового препарата обращают внимание на количество жизнеспособных клеток, которое должно быть не менее 80%. На флаконы наклеивают наклейку со штрих-кодом и с информацией (наименование продукта, дата выпуска и годности, условия хранения) и упаковывают в транспортировочный контейнер. На рисунке 1, показан опытный образец клеточного препарата для регенерации дефектов хряща.

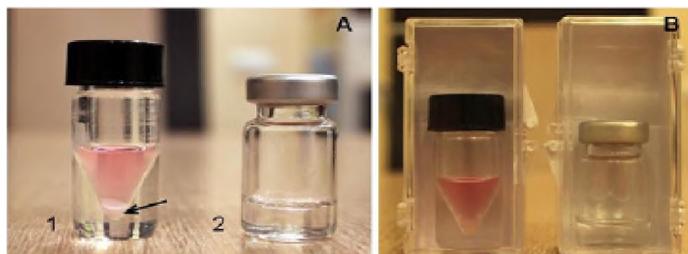


Рисунок 1 - Опытный образец клеточного препарата для регенерации дефектов хряща

- А) 1 – стеклянный флакон, содержащий 1×10^7 аутологичных МСК синовиальной оболочки человека (черная стрелка).
2 – препарат гиалуриновой кислоты. В) клеточный препарат в транспортировочном контейнере

На рисунке 2 показан технологический процесс получения клеточного препарата (МСК из синовиальной оболочки).

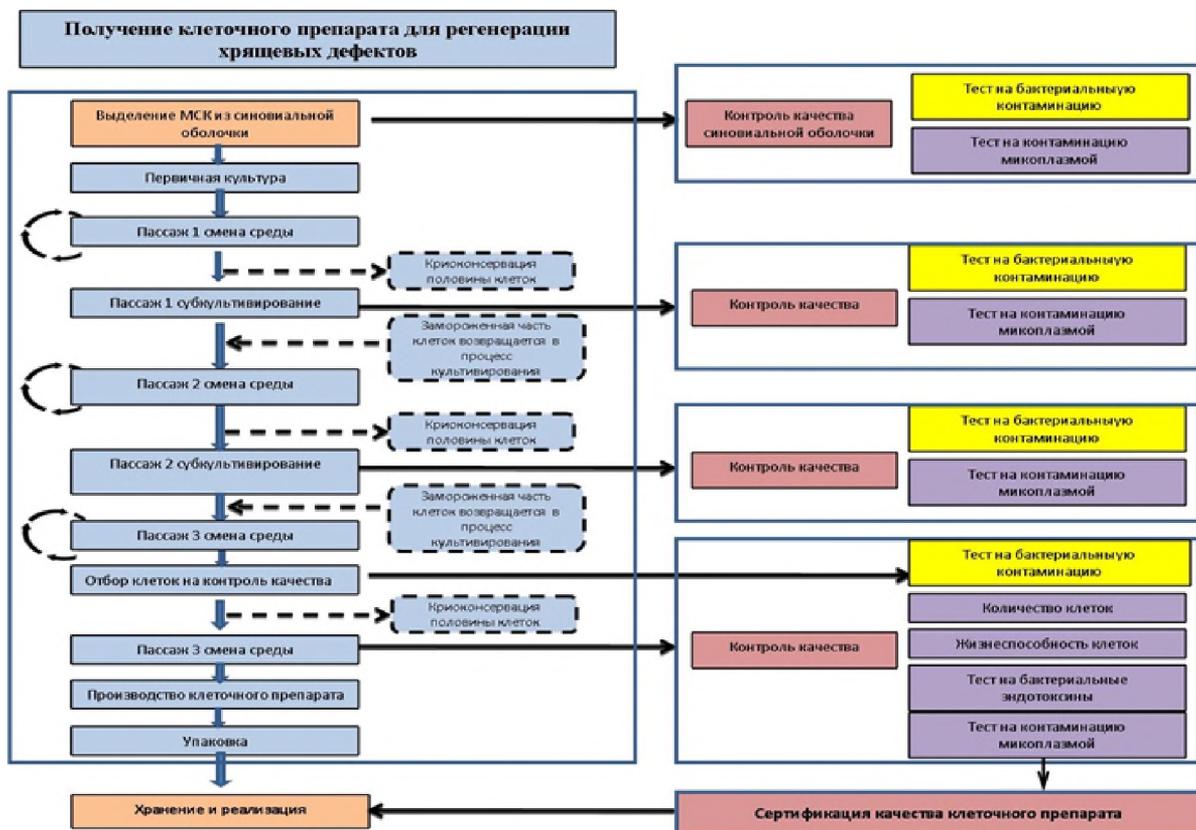


Рисунок 2 - Технологическая схема производства клеточного препарата (МСК из синовиальной оболочки)

Для получения первичных культур МСК синовиальной оболочки человека за основу был взят метод, предложенный ранее Cosimo De Bari и др. [6].

Выделение клеток из синовиальной оболочки человека проводили согласно схеме, которая представлена на рисунке 3.



Рисунок 3 - Схема выделения МСК из синовиальной оболочки коленного сустава

В результате выделения средний выход клеток из 1 мг синовиальной оболочки составлял $1,5-2,0 \times 10^4$ клеток. После ресуспендирования в полной питательной среде StemPro, клетки были рассеяны в культуральные флаконы с расчетом 1×10^4 клеток/см² и культивировали при 37°C и 5% CO₂. После 2 пассажа был проведен морфологический анализ, тест на образование колоний и фенотипирование.

Результаты анализа показали, что культивируемые клетки синовиальной оболочки имели хорошо выраженную фибробластоподобную морфологию и крупное овальное ядро с характерными двумя или более ядрышками (рисунки 4А и 4В). Более того, было обнаружено, что эти клетки обладают высокой пролиферативной активностью и способностью формировать колонии (рисунок 4С).

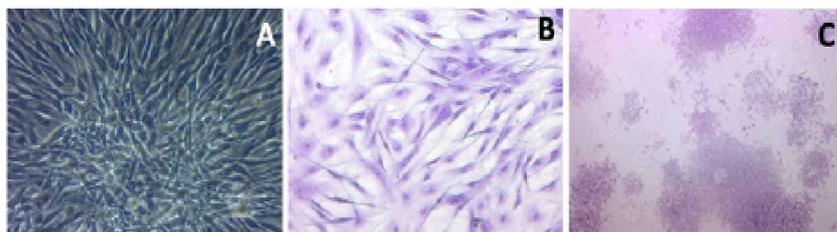


Рисунок 4 - Морфология и клоногенная активность МСК синовиальной оболочки человека

Далее, для того чтобы доказать, что полученные культуры МСК человека являются фенотипически гомогенными клеточными популяциями проводился иммуноцитохимический анализ с использованием антител к специфичным маркерам МСК: CD105, CD90 и CD73. В качестве негативного контроля использовали антитела к маркеру гемопоэтических клеток CD45. Результаты анализа показали, что клетки, выделенные

из синовиальной оболочки коленного сустава человека, имеют фенотип МСК с достоверно выраженной экспрессией CD105, CD90 и CD73 (рисунок 5).

Таким образом, наличие вышеперечисленных свойств у клеток, выделенных нами из синовиальной оболочки человека, подтверждает их принадлежность к классу мезенхимальных стволовых клеток.

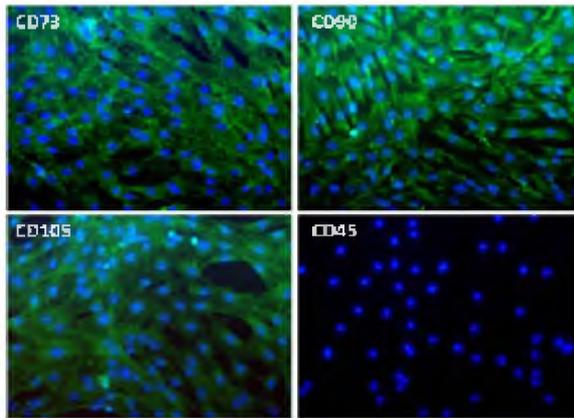


Рисунок 5 – Иммунофенотипирование МСК, выделенных из синовиальной оболочки коленных суставов человека

Далее для МСК каждого пациента проводили тест на бактериальную, дрожжевую и грибковую контаминацию, тест на определение микоплазмы в культивированных клетках, тест на бактериальные эндотоксины. МСК всех пациентов показали

отсутствие бактериальной, дрожжевой и грибковой контаминации, микоплазмы, бактериальных эндотоксинов (рисунок 6).

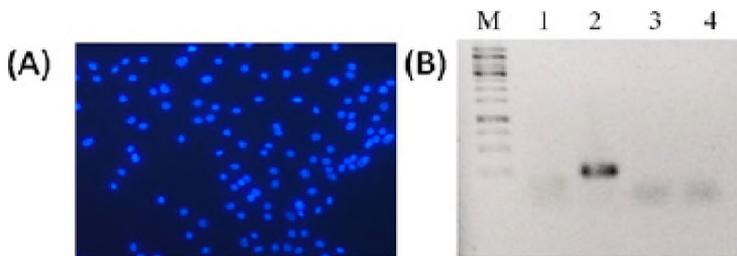


Рисунок 6 – Результаты тестов на определение контаминаций в культуре МСК человека

А – Снимок полученный с помощью флуоресцентного микроскопа показывает отсутствие в культуре МСК бактерий, дрожжей и грибов. Видны только ядра МСК окрашенные красителем DAPI (синий).

В – ПЦР-анализ культуры МСК на наличие микоплазмы. М – маркер, 1 – негативный контроль, 2 – позитивный контроль, 3 и 4 – опытные образцы МСК человека

При выдаче клеточного препарата прилагали сертификат контроля качества, гарантирующий безопасность полученных МСК синовиальной оболочки пациента.

Для лечения 12 пациентов с остеоартрозом коленного сустава были использованы МСК. У всех пациентов констатирован остеоартроз коленных суставов, возраст варьировал от 50 до 81 года, средний возраст $62,75 \pm 3,3$ лет. Пациенты находились на стационарном лечении НИИТО в период с июня по сентябрь 2018 года.

В данной группе пациентов мужчин не было, все пациенты женского пола, с двусторонним остеоартрозом коленных суставов - 10 пациентов (83%), с односторонним остеоартрозом – 2 пациента (17%).

Из 12 пациентов в 83% случаев, или у 10 больных, верифицирована 2 степень остеоартроза, в 17% случаев, или у 2 больных - 3 степень остеоартроза.

Среди 12 пациентов у 8 больных или в 67% случаев отмечалась контрактура сустава.

Помимо клинического обследования всем пациентам выполнялось обязательное инструментальное исследование, включавшее рентгенографию коленного сустава в 2-х проекциях, а также МРТ коленного сустава.

На рентгенограммах коленного сустава в 2-х проекциях также изучались вторичные изменения костной ткани, как-то: изменение оси конечности, склероз субхондральной кости, формирование костных остеофитов, сужение суставной щели, наличие дополнительных включений в проекции полости сустава и др. Таким образом устанавливалась рентгенологическая стадия заболевания.

На МРТ коленного сустава изучалось состояние мягких тканей, прежде всего состояние хряща, степень дегенерации хряща, менисков, связочного аппарата.

Всем пациентам произведен артроскопический экономный дебридмент коленного сустава, включающий удаление нестабильных элементов сустава (поврежденные мениски, элементы передней

крестообразной связки, хондромные тела, свободные края дефектов хряща), резекцию жирового тела при ее гиперплазии, рассечение или иссечение утолщенных, склерозированных синовиальных складок.

Кроме дебридмента сустава выполнялся забор синовиальной ткани коленного сустава.

После культивирования МСК синовиальной оболочки препарат вводился в полость пораженного коленного сустава в растворе гиалуроновой кислоты.

Оценка исходного состояния суставов, результаты лечения проводились при помощи шкалы Лисхольма и шкалы оценки функции коленного сустава KSS (Knee Society Scores), болевой синдром оценивался по шкале ВАШ, а также по результатам рентгенографии и МРТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предоперационная средняя оценка по шкале Лисхольма составила $51,7 \pm 3,7$. Через 4 недели после операции - $71,8 \pm 2,2$. Через 24 недели средняя оценка по шкале Лисхольма составила $83,3 \pm 1,9$.

Согласно шкале Лисхольма функциональное состояние коленного сустава после применения МСК оказалось достоверно лучше во все сроки наблюдения, при этом наблюдался восходящий эффект.

Болевой синдром в коленном суставе оценивался при помощи 10-балльной шкалы ВАШ до вмешательства, а также через 4 и 24 недели после операции.

Показанные результаты: дооперационная средняя оценка интенсивности болевого синдрома $5,9 \pm 0,4$, через 4 недели после вмешательства интенсивность болевого синдрома равнялись $2,8 \pm 0,3$, через 24 недели - $3,2 \pm 0,6$ в основной группе.

Таким образом, при лечении пациентов с дефектом хрящевой ткани применение МКС позволило снизить болевой синдром во все сроки наблюдения.

Для объективизации результатов лечения пациентов с дефектами хрящевой ткани также применялась шкала оценки функции коленного сустава KSS, разработанная и предложенная Американским обществом патологии коленного сустава. Оценка функции коленного сустава проводилась перед

Шкала функционирования коленного сустава Лисхольма (Lyshlom Knee Score) разработана для оценки результатов лечения разных заболеваний коленного сустава. Оценка состояния производится в баллах, с максимальной суммой в 100 баллов. Результаты оценивались перед вмешательством, через 4 и 24 недели после операции.

Расчет баллов проводится на основе анкетных данных пациентов. По шкале Лисхольма оцениваются следующие параметры: хромота, использование дополнительных средств опоры, блокирование сустава, нестабильность сустава, боль, отек и припухлость в области сустава, ходьба по лестнице, сидение на корточках.

операцией, при выписке, а также через 4 и 24 недели после вмешательства.

Определение общего количества баллов проводится также на основе анкетирования пациентов. Шкала KSS состоит из двух частей: клинической и функциональной частей. Оцениваются следующие параметры: болевой синдром, дефицит разгибания – сгибательная контрактура, амплитуда движений сустава, стабильность сустава, а также функция сустава при ходьбе, ходьбе по лестнице и необходимость дополнительных средств опоры.

Предоперационная оценка составила $48,2 \pm 4,2$, через 4 недели после вмешательства $65,6 \pm 3,2$, через 24 недели после операции $72,7 \pm 1,5$.

Таким образом, по шкале KSS функциональное состояние коленного сустава после применения МСК также оказалось лучше во все сроки наблюдения, динамика оказалась сопоставимой со шкалой Лисхольма.

Анализ рентгенограмм коленного сустава через 24 недели после операции не выявил изменений.

На МРТ коленного сустава в динамике через 6 месяцев после инъекции МСК синовиальной оболочки оценивалось состояние сустава, особенно состояние хряща, констатировано отсутствие прогрессирования дегенеративного процесса.

ВЫВОДЫ

Таким образом, использование МСК синовиальной оболочки коленного сустава для лечения дегенеративно-дистрофических поражений суставов позволяет добиться положительного эффекта, исследование подтвердило положительное прикладное значение метода. Для ортопедов метод

является несложным и надежно воспроизводимым. Основное препятствие в более широком применении метода заключается в необходимости привлечения смежных специалистов – биотехнологов, на которых ложится основная нагрузка по культивированию мезенхимальных стволовых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Newman A.P. Articular cartilage repair. *American Journal of Sports Medicine*. 1998; 26(2): 309-24. <https://doi.org/10.1177/03635465980260022701>.
2. Buckwalter J.A. Articular cartilage injuries. *Clinical Orthopaedics Related Research*. 2002; 402: 21–37. <https://doi.org/10.1097/00003086-200209000-00004>.
3. Khan W.S., Johnson D.S., Hardingham T.E. The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *Knee*. 2010; 17(6): 369-74. <https://doi.org/10.1016/j.knee.2009.12.003>.
4. Freyria A.M., Mallein-Gerin F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Injury*. 2012; 43(3): 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.05.035>.
5. Kuroda R., Usas A., Kubo S., Corsi K., et al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheumatism*. 2006; 54(2): 433–442. <https://doi.org/10.1002/art.21632>.
6. De Bari C., Dell'Accio F., Vanlauwe J., Eyckmans J., et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum*. 2006; 4: 1209–1221. <https://doi.org/10.1002/art.21753>.

Тізе буынының дегенеративті-дистрофиялық ауруларының синовиалды мембрананың мезенхималық дің жасушаларын қолдануға негізделген емі

Бәтпенев Н.Д. ¹, Раймағамбетов Е.К. ², Қорғанбекова Г.С. ³, Сәрсенова М.А. ⁴, Исабекова А.С. ⁵,
Жүнісова М.С. ⁶, Огай В.Б. ⁷

¹ Травматология және ортопедия ғылыми-зерттеу институтының директоры, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.
E-mail: niitokz@med.mail.kz

² №5 ортопедия бөлімшесінің меңгерушісі, Травматология және ортопедия ғылыми-зерттеу институты, Нұр-Сұлтан, Қазақстан. E-mail: raimagambetov_e@niito.kz

³ №5 ортопедия бөлімшесінің дәрігер-травматологы, Травматология және ортопедия ғылыми-зерттеу институты, Нұр-Сұлтан, Қазақстан. E-mail: gsk28@mail.ru

⁴ Ұлттық биотехнология орталығының ғылыми қызметкері, Нұр-Сұлтан, Қазақстан. Email: info@biocenter.kz

⁵ Ұлттық биотехнология орталығының аға ғылыми қызметкері, Нұр-Сұлтан, Қазақстан. Email: info@biocenter.kz

⁶ Ұлттық биотехнология орталығының кіші ғылыми қызметкері, Нұр-Сұлтан, Қазақстан. Email: info@biocenter.kz

⁷ Ұлттық биотехнология орталығының дің жасушалары зертханасының меңгерушісі, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Email: info@biocenter.kz

Түйіндеме

Аутологиялық мезенхималық дің жасушаларын қолданып, тізе буындарының шеміршектерінің патологиясы бар 12 науқас сәтті емделді. Бірінші кезеңде барлық науқастар тізе буынының дәстүрлі артроскопиялық дебрировкасынан өтті, оның барысында синовиалды сынама алынды. Содан кейін үлгі мезенхималық дің жасушаларын өсіру үшін Ұлттық биотехнология орталығына жіберілді. Ем үшін қажетті көлемдегі жасушалардың санын өсіргеннен кейін, материал зақымдалған буынның қуысына енгізілді. Нәтижелерді бағалау нәтижесі әдістің ауру ағымына оң әсер бар екенін көрсетті.

Түйін сөздер: тізе буынының дегенеративті-дистрофиялық аурулары, жасушалық технологиялар, мезенхималық дің жасушалары.

Treatment of Degenerative-Dystrophic Diseases of the Knee Joint Based on the use of Mesenchymal Stem Cells of the Synovial Membrane

Nurlan Batpenov ¹, Yerik Raimagambetov ², Gulzhanat Korganbekova ³, Madina Sarsenova ⁴, Assel Isabekova ⁵,
Madina Zhunussova ⁶, Vyacheslav Ogay ⁷

¹ Director of the Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics,
Nur-Sultan, Kazakhstan. E-mail: niitokz@med.mail.kz

² Head of the Department of Orthopedics No. 5, Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nur-Sultan, Kazakhstan. E-mail: raimagambetov_e@niito.kz

³ Traumatologist of the Department of Orthopedics No. 5, Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nur-Sultan, Kazakhstan. E-mail: gsk28@mail.ru

⁴ Researcher of the National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan. Email: info@biocenter.kz

⁵ Senior Researcher of the National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan. Email: info@biocenter.kz

⁶ Junior Researcher of the National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan. Email: info@biocenter.kz

⁷ Head of Stem Cell Laboratory of the National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan. Email: info@biocenter.kz

Abstract

Using autologous mesenchymal stem cells, 12 patients with pathology of the knee joint cartilage were successfully treated. At the first stage, all patients underwent traditional arthroscopic knee debridement, during which a sample of the synovium was taken, after which the sample was transferred to the National Center for Biotechnology for the cultivation of mesenchymal stem cells. After culturing a therapeutically effective number of cells, the material was punctured into the cavity of the affected joint. Evaluation of the results demonstrated a positive effect of the method on the course of the disease.

Key words: degenerative-dystrophic diseases of the knee joint, cell technologies, mesenchymal stem cells.