



УДК 616.728.3/.4-003.823-089

Р.З. САЛИХОВ¹, Р.Ф. МАСГУТОВ^{1,2}, А.А. РИЗВАНОВ^{1,2}, И.И. САЛАФУТДИНОВ^{1,2}, Ю.А. ПЛАКСЕЙЧУК¹, В.В. СОЛОВЬЕВ¹¹Республиканская клиническая больница МЗ РТ, 420064, г. Казань, Оренбургский тракт, д. 138²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

Лечение пациентов с дефектами гиалинового хряща коленного и голеностопного сустава с применением клеток стромально-сосудистой фракции из жировой ткани

Салихов Рамиль Заудатович — врач травматолог-ортопед, старший научный сотрудник научного отдела, тел. +7-917-285-28-28, e-mail: ramils@list.ru**Масгутов Руслан Фаридович** — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научного отдела, старший научный сотрудник лаборатории «OpenLab» генные и клеточные технологии, тел. +7-950-314-02-93, e-mail: masgut@gmail.com**Ризванов Альберт Анатольевич** — доктор биологических наук, главный научный сотрудник научного отдела, профессор кафедры генетики, тел. +7-905-316-75-99, e-mail: rizvanov@gmail.com**Салафутдинов Ильнур Ильдусович** — кандидат биологических наук, научный сотрудник научного отдела, старший научный сотрудник лаборатории «OpenLab» генные и клеточные технологии, тел. +7-917-867-43-60, e-mail: sal.ilnur@gmail.com**Плаксейчук Юрий Антонович** — кандидат медицинских наук, ведущий сотрудник научного отдела, заведующий отделением ортопедии № 1, тел. +7-917-269-60-01**Соловьев Владислав Всеволодович** — врач травматолог-ортопед, научный сотрудник научного отдела, тел. +7-927-672-42-99

Представлены результаты лечения 19 пациентов с дефектами хряща коленного и голеностопного суставов, которым проведена клеточная терапия с использованием гетерогенной популяции клеток стромально-сосудистой фракции (ССФ), полученной из жировой ткани, со сроком наблюдения до трех лет. Предварительно всем больным выполнена лечебно-диагностическая артроскопия, во время которой были оценены размеры хондрального дефекта, глубина поражения, локализация. Под местной анестезией проведен забор жировой ткани, из которой в последующем выделены клетки стромально-сосудистой фракции согласно протоколу. Проведена миниартротомия коленного сустава с фиксацией клеточного материала фибриновым клеем 5 пациентам, 14 пациентам — инъекционное введение в пораженный сустав. Положительный эффект на сроке 6 месяцев и более отмечен у 84,2%. Клеточная терапия с использованием стромально-сосудистой фракции из жировой ткани может быть эффективным методом лечения пациентов с дефектами хряща нагружаемых суставных поверхностей даже при наличии признаков остеоартроза.

Ключевые слова: артроскопия, дефекты хряща, клетки стромально-сосудистой фракции.

R.Z. SALIKHOV¹, R.F. MASGUTOV^{1,2}, A.A. RIZVANOV^{1,2}, I.I. SALAFUTDINOV^{1,2}, Yu.A. PLAKSEYCHUK¹, V.V. SOLOVYEV¹¹Republican Clinical Hospital MH of RT, 138 Orenburgskiy Trakt, Kazan, Russian Federation, 420064²Kazan (Volga region) Federal University, 18 Kremlevskaya St., Kazan, Russian Federation, 420008

Treatment of patients with hyaline cartilage defects of knee and ankle joints using stromal vascular fraction cells from adipose tissue

Salikhov R.Z. — traumatologist-orthopedist, Senior Researcher of Scientific Department, tel. +7-917-285-28-28, e-mail: ramils@list.ru**Masgutov R.F.** — Cand. Med. Sc., Senior Researcher of Scientific Department, Senior Researcher of «OpenLab» laboratory (genetic and cell technologies), tel. +7-950-314-02-93, e-mail: masgut@gmail.com**Rizvanov A.A.** — D. Biol. Sc., Chief Researcher of Scientific Department, Professor of the Department of Genetics, tel. +7-905-316-75-99, e-mail: rizvanov@gmail.com

Salafutdinov I.I. — Cand. Biol. Sc., Researcher of Scientific Department, Senior Researcher of «OpenLab» laboratory (genetic and cell technologies), tel. +7-917-867-43-60, e-mail: sal.ilnur@gmail.com

Plakseichuk Yu.A. — Cand. Med. Sc., Leading Researcher of Scientific Department, Head of Orthopedics Department № 1, tel. +7-917-269-60-01

Solov'ev V.V. — traumatologist-orthopedist, Researcher of Scientific Department, tel. +7-927-672-42-99

We present the results of treatment of 19 patients with cartilage defects of the knee and ankle joints, who were treated with stromal vascular fraction cells obtained from adipose tissue with a follow-up of up to 3 years. All the patients underwent pre-treatment and diagnostic arthroscopy, during which the extent of chondral defects, depth and localization of lesions were evaluated. Under local anesthesia, the samples of adipose tissue were taken, from which the cells of stromal vascular fraction were subsequently isolated according to the previously described protocol. 5 patients underwent mini-arthrotomy of knee joint with locking cellular material with fibrin glue, 14 patients underwent injecting into the affected joint. Positive effect on the period of 6 months or more was observed in 84.2% of patients. Cell therapy using stromal vascular fraction cells from adipose tissue may be an effective treatment for patients with cartilage defects of the articular surfaces even in case of osteoarthritis.

Key words: arthroscopy, cartilage defects, stromal-vascular fraction cells.

Развитие медицины XXI века сегодня напрямую связывают с использованием клеточных технологий, которые являются одним из приоритетных направлений совершенствования науки в сфере высоких технологий. Список болезней, при лечении которых клеточные технологии уже используются или их применение планируется в ближайшем будущем, стремительно растет. Травматология и ортопедия в этом смысле стоят на передовых позициях, уступая лишь онкогематологии. Одним из приоритетных направлений является лечение дефектов суставного гиалинового хряща, возникших в результате непосредственно травмы или являющихся проявлением остеоартроза.

Повреждения суставного хряща нередки. Наиболее часто встречается травма хряща коленного сустава, составляя около 18% от повреждений нижних конечностей и от 5 до 7%, по данным разных авторов, в детской травматологической практике [1, 2]. У спортсменов частота повреждений коленного сустава составляет 60-68% [3]. Частота сложных переломов дистального суставного отдела костей голени — до 10-20% по отношению ко всем переломам костей нижних конечностей [4].

Хрящевая ткань характеризуется низкими репаративными возможностями. Хрящ, покрывающий суставные поверхности костей, не имеет надхрящницы, что делает невозможным клеточную регенерацию. Рост хрящевой ткани возможен путем аппозиционного роста — за счет размножения хондробластов, вырабатывающих основное вещество и в дальнейшем превращающихся в хондроциты, и путем интерстициального роста — за счет развития нового основного вещества вокруг хондроцитов. Слабая васкуляризация этой зоны, часто отсутствующая при развитии остеоартроза, препятствует миграции хондроцитов, клеток крови и костного мозга в зону возникшего дефекта. В случае образования гематомы, например, при остеохондральных дефектах, запускается процесс регенерации с миграцией клеток крови и костного мозга, которые выделяют различные биологические факторы, стимулирующие ангиогенез и ремоделирование хрящевой ткани. Однако регенерация хрящевой ткани, в отличие от костной, происходит обычно неполно, особенно при наличии крупных дефектов (более 1 см²). При этом образуется не гиалиновый, а волокнистый (фиброзный) хрящ, который имеет иную цитоархитектонику, биохимический состав матрикса и лишен необходимой эластичности. Поиск биотехнологических способов восстановления полнослойных дефектов гиалинового хряща на-

правлен на получение достаточного количества клеток-предшественников хондробластов, применение оптимального носителя, выбор способа доставки и фиксации в зоне повреждения [5].

В ряде исследований показано, что гетерогенная популяция клеток стромально-сосудистой фракции может служить источником хондрогенеза [6, 7]. Стромально-сосудистая фракция (ССФ) помимо мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток содержит ряд клеточных типов, стимулирующих процессы регенерации и ревазуляризации, а также клетки, обладающие противовоспалительным и иммуномодулирующими свойствами. Клетки стромально-сосудистой фракции содержатся в костном мозге, жировой ткани, мышечной ткани, миокарде, пульпе зуба, надкостнице, крови. Жировая ткань является наиболее доступным и богатым источником клеток ССФ.

В статье представлен опыт лечения пациентов с повреждениями гиалинового суставного хряща коленного и голеностопного суставов с применением клеток стромально-сосудистой фракции, полученной из жировой ткани.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 19 пациентов: 16 женщин и 3 мужчин. Средний возраст составил 49 лет (от 18 до 58). С патологией коленного сустава было 17 пациентов, голеностопного сустава — 2 пациента. Травма в анамнезе была у 15 пациентов (у 9 — бытовая, у 3 — уличная, у 3 — спортивная). Профессиональных спортсменов не было. Период наблюдения составил до 3 лет. Критериями отбора служили: хондральные и остеохондральные дефекты коленного или голеностопного сустава, возраст 18-60 лет, хондромалиция III и IV стадии (по Outerbridge), площадь дефекта 3 см² и более, нормальный неповрежденный прилегающий хрящ, отсутствие повреждения менисков, связочного аппарата, системных заболеваний и онкологических процессов.

На 1-м этапе пациентам проводился клинический осмотр, рентгенография и МРТ пораженного сустава, артроскопия. При артроскопическом исследовании выяснялся размер и степень хондрального или остеохондрального дефекта, состояние прилегающего хряща, менисков, связочного аппарата. Все 17 пациентов с патологией коленного сустава имели дефект медиального мыщелка бедренной кости. Из них у 5 пациентов имелся дефект 5-6 см² (у 3 пациентов III ст., у 2 пациентов IV ст. по Outerbridge). У 12 пациентов имелся дефект



3-4 см² (у 8 пациентов III ст., у 4 пациентов IV ст. по Outerbridge). У 2 пациентов с патологией голеностопного сустава дефект составил 3 см² (у 1 пациента III ст., у 1 пациента IV ст. по Outerbridge).

На 2-м этапе оформлялось согласие на участие в клиническом исследовании «Усовершенствованные методы лечения повреждений и заболеваний крупных суставов и костей». Под местной анестезией производилась липосакция жировой клетчатки с области передней брюшной стенки с последующим выделением ССФ согласно протоколу. Для этого выполнялся разрез кожи около 5 мм, через который подкожно вводился липосактор соединенный с вакуум-насосом. Производился забор фрагментированной жировой ткани объемом 150-1000 мл в стерильный сосуд, количество забранной жировой ткани зависело от количества жировой ткани у пациента. Процедура выделения ССФ производилась в стерильных условиях в ламинаре с использованием одноразовых расходных материалов. Сначала забранная жировая ткань промывалась в фосфатном буфере 3 раза по 5 минут, производилась аспирация буфера, далее жировая ткань растворялась в 0.1% коллагеназе в течение 40 минут в шейкере при температуре 37°C, затем зрелые адипоциты и соединительная ткань отделялись от стромальной сосудистой фракции путем центрифугирования (800 об./мин., 10 мин.). Для удаления эритроцитов полученные клетки ресуспензировались в лизирующем буфере (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) в течение 5 минут при комнатной температуре, затем промывались в фосфатном буфере и центрифугируются в режиме 800 об./мин., 10 минут. Подсчет клеток производится в камере Горяева с использованием трипанового синего для определения количества жизнеспособных клеток. Лабораторная оценка клеточного материала производилась методом фенотипирования со специфическими антителами против CD31, CD34, CD 45, CD90, CD105.

После подготовки клеточного материала 5 пациентам произведена артротомия коленного сустава. Дефект хрящевой ткани заполнялся стромальной сосудистой фракцией с фиксацией фибриновым клеем «Тиссукол кит». Рана ушита послойно наглухо. 14 пациентам стромально-сосудистая фракция вводилась инъекционно, пациентам с поражением голеностопного сустава под контролем ЭОП.

В послеоперационном периоде пациенту предписывалась реабилитационная программа. Период I (с 1-й по 6-ю неделю): ходьба на костылях, нагрузка на больную ногу не более половины веса тела, пассивные движения в суставе до 90 градусов. Период II (с 6-й по 12-ю неделю): ходьба на костылях до 8-9-й недели с нагрузкой до 80% веса тела, непостоянное ношение наколенника, пассивное разгибание сустава и сгибание до 125 градусов, стимуляция мышц бедра и голени. Период III (с 12-й по 26-ю неделю): свободный режим ходьбы до 3 км в день, бег трусцой с 20-й недели, сгибание в суставе до 135 градусов. Период IV (с 26-й по 52-ю неделю): движения в коленном суставе без ограничений, занятия спортом: плавание в бассейне, езда на велосипеде с 6 месяцев, аэробика и бег с 8 месяцев, командные игровые виды спорта с 12 месяцев.

Результаты

Положительный эффект на сроке 6 месяцев и более отмечен у 16 пациентов (84,2%), из них у

14 пациентов с патологией коленного сустава, у обоих пациентов с патологией голеностопного сустава. У 5 пациентов трансплантация клеток ССФ было осуществлено путем артротомии, у 10 пациентов инъекционно. Усиление болевого синдрома на сроке 6-12 месяцев отметили 3 пациента с патологией коленного сустава (15,8%). Данные пациенты имели избыточный вес и рентгенологические признаки остеоартроза. Отрицательная рентгенологическая симптоматика не отмечена ни у одного пациента. Клиническая оценка результатов проведена согласно Оксфордской шкале для коленного сустава из 12 пунктов (Oxford-12 Item Knee Score) [8]. Шкала характеризует выраженность болевого синдрома и возможности больного по выполнению обычных, повседневных нагрузок. Нормальным показателем является сумма, равная 12 баллам, при наличии ОА сумма баллов увеличивается до 60 баллов. При обследовании до операции средний балл составил 49±7 балла, на сроке 12 месяцев после операции отмечено уменьшение до 15±3 балла. Для клинического анализа лечения пациентов с патологией голеностопного сустава использована шкала AOFAS (максимум 100 баллов) [9]. При обследовании до операции средний балл составил 38±4 балла, на сроке 12 месяцев после операции отмечено увеличение до 78±6 баллов.

У одной пациентки проведено повторное артроскопическое исследование коленного сустава в связи с жалобами на боли механического характера при движениях. При артроскопии выявлено полное покрытие зоны дефекта хряща в медиальном отделе бедренной кости гиалиноподобным хрящом, близким по эластичным свойствам к здоровому хрящу, с формированием «плюс ткани» в виде створки с одного края, что вызывало соприкосновение с большеберцовым платом при движениях. Произведено удаление «плюс ткани» с моделированием нормального контура хряща с помощью артрошейвера. Сразу после операции пациентка отметила улучшение в виде исчезновения болевого синдрома. По данным МРТ у этой пациентки, а также у ряда других пациентов, было отмечено уменьшение зоны трабекулярного отека медиального мыщелка бедренной кости, покрытие зоны дефекта хряща.

Обсуждение

Известно, что артроскопия с выполнением абразивной хондропластики, микрофрактуринга, лаваж сустава имеет положительный эффект в ближайшие сроки. В то же время на отдаленных сроках, как правило, наблюдается прогрессирование остеоартроза [10, 11]. Полученные нами в большинстве случаев (более 80%) положительные результаты с длительным сроком наблюдения (до 3 лет) позволяют с надеждой говорить об эффективности примененного подхода. Анализ результатов позволил выявить следующие закономерности: при наличии хондрального дефекта большого размера и хорошего состояния окружающего суставного хряща оптимальным является миниартротомия с фиксацией клеток стромальной сосудистой фракции непосредственно в зоне дефекта фибриновым клеем. При наличии глубокого хондрального дефекта средних размеров и измененного окружающего хряща (т.е. развитие остеоартроза), а также локализации хондральных дефектов в труднодоступных областях оптимальным является введение клеток ССФ инъекционным путем. В менее

крупные суставы (голеностопный, локтевой) также оправдан инъекционный метод введения.

Заключение

Дефекты хряща суставных поверхностей могут быть как проявлением остеоартроза, так и служить причиной его развития. Остеоартроз относится к полиэтиологическим мультифакториальным заболеваниям. Генетические, эволюционные, метаболические и травматические причины могут приводить к нарушениям процессов образования клеток суставного хряща и субхондральной кости. Сущность управляемой регенерации любой ткани состоит из комбинации биологических и биомеханических подходов. Выбранное нами направление применения клеточных технологий относится, по сути, к трансплантации соединительнотканых клеток-предшественниц в участок их локального дефицита. Проведенное хирургическое лечение дефектов хряща коленного и голеностопного суставов с применением клеток стромальной сосудистой фракции, полученных из жировой ткани пациента, позволило сократить сроки лечения и выполнить его в течение одного пребывания в стационаре. С учетом сроков проведения операций можно говорить о предварительных положительных результатах в виде уменьшения болевого синдрома, увеличения объема движений в суставе у большинства пациентов с сохранением эффекта до 3 лет. В то же время требуются дальнейшие исследования и клинические наблюдения, направленные на выявление факторов, которые позволят улучшить результаты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лаврищева Г.И. Об особенностях регенерации суставного хряща // В кн.: Регенерация и клеточное деление. — М., 1968. — С. 222-227.
2. Ушакова О.А., Лисицын М.П., Вачеишвили Г.О. Артроскопические парциальные менискэктомии // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1991. — №10. — С. 1-6.
3. Меркулов В.Н., Ушакова О.А., Шапошников Ю.Г. и др. Повреждения коленного сустава у детей. Артроскопическая диагностика и лечение. Методические рекомендации. — М., 1996. — 20 с.
4. Панков И.О. Хирургическое лечение неправильно сросшихся пронационно-эверсионных переломов дистального отдела костей голени / И.О. Панков, Р.З. Салихов, В.Р. Нагматуллин, А.Л. Емелин, И.А. Валитов // Электронный научный журнал «Современные проблемы науки и образования». — 2013. — №2. — URL: www.science-education.ru/108-8785.
5. Деев Р.В. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития / Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш, Р.М. Тихилов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2007. — Т. 2, №4. — С. 18-30.
6. Трактует Д.О. Стромальные клетки жировой ткани — пластический тип клеток, обладающий высоким терапевтическим потенциалом / Д.О. Трактует, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук, К.Л. Марч // Цитология. — 2006. — Т. 48, №2. — С. 83-93.
7. Lin Y. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vitro / Y. Lin, E. Luo, X. Chen et al. // J. Cell Mol. Med. — 2005. — Vol. 9, №4. — P. 929-939.
8. Jenny J.Y. Validation of a French version of the Oxford knee questionnaire / J.Y. Jenny, Y. Diesinger // Orthop Traumatol Surg Res. — 2011. — Vol. 97. — P. 267-271.
9. Kitaoka H. B. Clinical rating systems for the ankle-hindfoot, midfoot, hallux, and lesser toes / H.B. Kitaoka, I.J. Alexander, R.S. Adelaar, J.A. Nunley, M.S. Myerson, M. Sanders // Foot and Ankle Internat. — 1994. — Vol. 15. — P. 349-353.
10. Strobel M. Manual of Arthroscopic Surgery / M. Strobel // Springer Science & Business Media. — 2002. — 1090 p.
11. Стадников А.А. Новые методы хирургического лечения дефектов гиалинового хряща коленного сустава у больных с гонартрозом / А.А. Стадников и соавт. // Научно-практическая ревматология. — 2009. — №3. — С. 90-93.