

КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ

Влияние культивированных аутогенных соединительнотканых* (стромальных) клеток костного мозга (СККМ) на замедленно формирующиеся дистракционные регенераты у детей

С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, О.В. Кожевников, В.К. Ильина,
А.В. Иванов, И.Н. Карпов

ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
им. Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ

Influence of Autologous Connective Tissue (Stromal) Bone Marrow Cells (SBMC) Upon Delayed-Forming Distraction Regenerates in Children

S.P. Mironov, N.P. Omel'yanenko, V.K. Il'ina, A.V. Ivanov, I.N. Karpov

FSI «Central Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopaedics named after N.N. Priorov»
Ministry of Health and Social Development of Russian Federation

Представлены результаты применения культивированных аутогенных соединительнотканых* клеток костного мозга (СККМ) для стимуляции дистракционных костных регенератов у 8 детей в возрасте от 3,7 до 16 лет с врожденным неравенством длины нижних конечностей (основная группа), при их сравнении с группой пациентов, состоящей из 24 детей с аналогичной патологией в возрасте от 2,5 до 14 лет, лечившихся без применения клеточных технологий (группа контроля). Результаты проведенного лечения убедительно свидетельствуют о выраженном стимулирующем эффекте местного введения аутогенных клеток на формирование и «созревание» дистракционных костных регенератов при хирургической коррекции неравенства длины нижних конечностей. Продолжительность лечения в основной группе сократилась до 4,5–6,5 мес. при 7,5–11 мес. в контрольной группе. В дальнейшем, при росте детей, в основной группе удлиненные сегменты конечностей, после проведения хирургической коррекции неравенства длины с использованием клеточной терапии, отставали в меньшей степени в своем развитии, чем удлиненные сегменты конечностей у пациентов без лечения с использованием клеток. Очевидно, что применение СККМ оказало стимулирующее действие на рост всего сегмента корригируемой конечности, приближая темпы ее развития к физиологическим.

Сокращение периода лечения позволило исключить возможность осложнений, связанных с длительной фиксацией конечности в дистракционном аппарате и провести реабилитацию на более ранних сроках, чем у пациентов группы контроля, что в свою очередь улучшило анатомо-функциональные результаты лечения.

Ключевые слова: дети, неравенство длины нижних конечностей, регенерация, аутологичные стромальные клетки, костный мозг.

Компрессионно-дистракционный остеосинтез является широко распространенным методом коррекции длины и формы костей скелета. Устоялся эмпирически подобранный оптимальный темп дистракции костных фрагментов в аппарате внешней фиксации:

Results of cultivated autologous connective tissue bone marrow cells use for the stimulation of distraction bone regenerates in 8 children aged from 3.7 to 16.0 years with congenital lower extremities length discrepancy (main group) are compared with those achieved for 24 children aged 2.5–14.0 with similar pathology who were treated without application of cell technology (control group). Treatment results are indicative of marked stimulating effect of cell therapy upon the formation and maturation of distraction bone regenerates after surgical correction of lower extremities length discrepancy. In the main group duration of treatment reduced to 4.5–6.5 months versus 7.5–11 months in the control group. Subsequently with growth of children the elongated limb segments in children from the main group showed less delay in development as compared with elongated limb segments in patients from the control group. It is obvious that use of SBMC has exerted stimulating effect upon the growth of the whole segment of the operated extremity approximating the rates of its development the physiological ones.

Reduction of treatment duration enabled to avoid potential complications related to prolonged extremity fixation in distraction apparatus and to perform rehabilitation at earlier terms than in patients from the control group that led to the improvement of anatomical and functional results.

Key words: children, lower extremities length discrepancy, regeneration, autologous stromal cells, bone marrow.

в среднем 1 мм в сут., дозированно [1]. Изменение темпа дистракции может приводить к нарушению формирования регенератов. Но при определенных патологических состояниях соединительной ткани (в т. ч. костной), у пациентов с врожденными анома-

* «Соединительнотканые» и «стромальные» клетки костного мозга в данном контексте идентичны.

e-mail: omel156@yandex.ru

лиями развития (неравенством длины, как одним из проявлений диспластического синдрома), формирование костного регенерата, несмотря на соблюдение всех правил компрессионно-дистракционного остеосинтеза, может быть замедленным или осложненным [2–4]. В связи с этим, очевидна необходимость стимуляции репаративного остеогенеза на различных этапах формирования костного регенерата, прежде всего у пациентов с врожденной патологией опорно-двигательного аппарата [5, 6].

Основным механизмом репаративной костной регенерации является пролиферация коммитированных остеогенных клеток, находящихся в периосте и эндосте вблизи зоны костного повреждения и последующий синтез межклеточного матрикса. В связи с этим, механизм стимуляции репаративного остеогенеза заключается прежде всего в активизации резидентных остеогенных клеток-предшественников в зоне костного повреждения [7]. Для этого может быть использована трансплантация в зону повреждения аутогенных клеток-предшественниц (остеогенных в том числе), выделенных из костного мозга и размноженных в культуре.

В ряде литературных источников имеются данные о стимулирующем действии аутогенных стромальных клеток костного мозга (СККМ), трансплантированных как в костные дефекты [8, 9], так и в дистракционные регенераты [10, 11]. Почти все работы выполнены в эксперименте на животных и лишь в одной работе свободная пересадка стромальных клеток костного мозга проводилась в дистракционный регенерат человека (два пациента) [12]. Однако, в этом исследовании [12] стромальные клетки перед имплантацией подвергались предварительной остеогенной дифференцировке, и далее имплантировались вместе с тромбоцитарной массой (PRP). Таким образом, все вышесказанное указывает на перспективность использования СККМ.

Целью настоящей работы являлось клиническое исследование действия аутогенных СККМ на процесс репаративного остеогенеза в дистракционных регенератах длинных трубчатых костей нижних конечностей у детей, которым производилась коррекция неравенства длины нижних конечностей.

Клиническое исследование было утверждено Ученым советом ФГУ «ЦИТО им. Н.Н. Приорова» Минздравоохранения России, а его протокол рассмотрен и разрешен Этическим комитетом того же учреждения.

Материал и методы

В исследование были включены 32 пациента с врожденным неравенством длины нижних конечностей. Пациенты не имели отягощенного соматического анамнеза и сопутствующих заболеваний.

Пациенты были разделены на две группы. Основная группа состояла из 8 пациентов в возрасте от 3,7 до 16 лет. Дефицит длины конечности за счет бедренной кости был у 3 больных, за счет костей голени — у 4 пациентов и за счет обоих сегментов у 1 пациента. Неравенство длины составляло от 3,5 до 8 см. В этой группе пациентам проводили точную трансплантацию аутогенных стромальных клеток костного мозга (СККМ). Все манипуляции выполнялись после получения добровольного информированного согласия на проведение исследования.

Контрольная группа была представлена 24 пациентами в возрасте от 2,5 до 14 лет. Неравенство длины за счет бедренной кости было у 12 больных, за счет голени у 9 пациентов. Величина неравенства варьировала от 3,5 до 6 см. В этой группе при проведении коррекции неравенства длины конечностей дополнительных стимулирующих воздействий на формирующиеся регенераты не проводили.

Предоперационное обследование включало следующие методы: рентгенографию нижних конечностей на сетке Кирдана, стандартную рентгенографию сегмента с дефицитом длины в 2-х проекциях, ультразвуковую доплерографию (УЗДГ) сосудов нижних конечностей.

В послеоперационном периоде (во время дистракции) оценивали величину коррекции неравенства длины, форму и степень оксификации формирующегося дистракционного регенерата посредством рентгенографии, с выполнением контрольных снимков раз в 2 нед., а после фиксации аппаратом — ежемесячно до его демонтажа. С помощью ультразвуковой доплерографии и ультразвуковой доплерографии оценивали однородность формирующегося регенерата и микроциркуляцию области дистракции с определением индекса резистентности (RI) кровотока.

Компьютерную томографию выполняли у некоторых пациентов обеих групп до и после демонтажа аппарата.

Хирургическую коррекцию проводили согласно классической методике компрессионно-дистракционного остеосинтеза по Г.А. Илизарову [6], включающей наложение внешней конструкции (использовали аппараты спицевой, стержневой и спице-стержневой компоновки) [3] и выполнение остеотомии костей (кости) сегмента, подлежащего коррекции. Пересечение бедренной кости проводили в зоне дистального метафиза, большеберцовой кости в верхней метафизарной зоне, малоберцовой кости в нижней трети. Дистракцию в аппарате начинали на 5-е сут. после операции. Темп варьировал от 0,5 до 1 мм в сут. и зависел от степени формирования регенератов, определяемой по рентгенологической картине.

В сроки 3 нед., 1, 2, 4, 5, 6 мес. оценивали динамику «созревания» дистракционных регенератов по данным рентгенографии, ультразвуковой доплерографии, УЗДГ. Компьютерную томографию проводили перед динамизацией внешней дистракционной конструкции и после демонтажа аппарата.

При анализе рентгенограмм учитывали локализацию, однородность и интенсивность рентгенологических теней в области дистракции, что отражает процесс образования регенератов. По данным КТ оценивали степень заполнения поперечника томографического среза элементами костной ткани и формирование кортикальных слоев вновь образованной кости.

С помощью ультразвуковой доплерографии оценивали однородность и интенсивность оксификации дистракционного регенерата. По данным УЗДГ рассчитывали индекс резистентности (RI), отражающий степень формирования микроциркуляторного русла в области дистракции.

У пациентов основной группы при выполнении оперативного вмешательства, осуществляли трепанбиопсию крыла подвздошной кости корончатой фрезой диаметром 5 мм с захватом столбика тканей не более 10 мм, с одной или двумя кортикальными стенками. Из костного биоптата механическим

способом выделяли клеточную суспензию костного мозга для культивирования *in vitro*.

После центрифугирования осадок клеток мононуклеарной фракции (стромальные и гемопоэтические клетки) костного мозга с эритроцитами ресуспендировали в среде для культивирования клеток. Эксплантационная плотность в каждом культуральном флаконе с площадью дна 75 см² составляла 10⁶ всех ядродержащих клеток костного мозга. Клетки культивировали в стандартной ростовой среде и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина в атмосфере 5% CO₂.

Стромальные клетки костного мозга, начинали прикрепляться к поверхности дна флаконов постепенно (не одновременно) уже через 2 ч после первичного посева. С 3–6-х сут. в культурах формировались отдельно расположенные колонии фибробластоподобных клеток. Они представляли собой совокупность клеток всех соединительнотканых дифференцировочных (в том числе остеобластического) на разных этапах дифференцировки. К 10–14-м сут. колонии увеличивались в размерах, часть из них становилась многослойными. Далее колонии сливались, покрывая все дно флакона. Гемопоэтические клетки, сопровождающие стромальные клетки, при смене среды постепенно удалялись из культуры. Последующие рассевы СККМ производились каждые 5–7 сут. после образования последних сплошного монослоя (конфлюэнтного слоя) в культуральных флаконах. Через 25–30 сут. т.е. после 3-го пассажа наращивалось достаточное количество клеток для первой аутотрансплантации и дальнейшего культивирования необходимого для последующих трансплантаций и создания клеточного резерва путем криоконсервирования.

Для оценки жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Тест основан на способности сукцинатдегидрогеназы митохондрий живых клеток восстанавливать светло-желтый МТТ-тетразолиум (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) до нерастворимого темноокрашенного формазана.

Фенотипирование культивированных стромальных клеток костного мозга по клеточным антигенам проводили на лазерном проточном цитометре FACScan по программе Cellquest. На клетках культуры отсутствовали антигены, свойственные гемопоэтическим стволовым и коммитированным клеткам (CD34), лимфоцитам (CD3, CD20, CD23, CD25, CD45, CD80, HLA-DR), а также гранулоцитам, макрофагам и киллерным клеткам (CD11b, CD14, CD15, CD45). Напротив, на клетках культуры имелись антигены, общие для остеобластов и фибробластов CD10, CD44, CD54 (ICAM-1, 63, 98), что в сумме с экспрессией CD105 и CD90 соответствует специфическим характеристикам стромальных клеток.

Клеточный материал после культивирования исследовали на стерильность и проводили ДНК-диагностику на отсутствие внутриклеточных возбудителей вирусных инфекций. Все данные регистрировали в паспорте культуры клеток, который в дальнейшем прилагали к истории болезни пациента.

Наблюдение за ростом клеток и их структурной динамикой проводили с помощью светоптического инвертированного микроскопа Ti Nikon (Япония) с инкубационной камерой с использованием модулирующего контраста Хоффмана и дифференциального интерференционного контраста (ДИК) по Номарскому. При отсроченной или повторной коррекции дли-

ны конечности использовались ранее замороженные и хранившиеся в криобанке культуры стромальных клеток костного мозга пациентов, у которых производился забор клеток. Для этого из клеточного криобанка забирались криопробирка с соответствующей аутокультурой клеток, проводилось ее программное размораживание. Суспензия криоконсервированных клеток отмывалась от криопротектора и ресуспендировалась в среду для культивирования.

Стимуляцию регенерата в основной группе начинали на 21–30-е сут. distraction. Клеточный материал, предназначенный для использования, трижды отмывали от среды культивирования физиологическим раствором и помещали в физиологический раствор. В область distractionного регенерата клеточный материал вводили инъекционно в 1 мл физиологического раствора в количестве от 1 до 5 млн клеток (в зависимости от веса и возраста пациента) пятикратно в интервале от 5 до 7 сут., при необходимости используя рентгенотелевизионную технику.

Демонтаж аппарата осуществляли по результатам клинико-рентгенологического исследования. Демонтажу предшествовала динамизация (ослабление distractionных усилий) внешней конструкции в течение 3–4 нед.

Для количественной и качественной оценки продолжительности лечения использовали индекс фиксации и индекс остеосинтеза. Индекс фиксации рассчитывали как отношение продолжительности периода после стабилизации аппарата к общей величине удлинения сегмента (дни/см). Индекс остеосинтеза рассчитывали как отношение продолжительности периода лечения в аппарате к величине удлинения (дни/см).

В оценку «качества жизни» пациента входили следующие критерии: болевой синдром, остаточное неравенство длины конечности после лечения, амплитуда движений в смежных с удлиненным сегментом суставах, мышечная сила и форма удлиненного сегмента.

Результаты

У пациентов в группе контроля, через 3 нед. после операции distraction составляла от 15 до 18 мм (рис. 1). Рентгенологически регенерат был не выражен. Через 1 мес. distraction достигала 20–25 мм, на рентгенограммах отмечались слабые точечные тени, расположенные преимущественно вблизи опилов костных фрагментов. По интенсивности тени были близки к окружающим кость мягким тканям. На сроке 2 мес. distraction в большинстве случаев была закончена, и составляла от 35 до 55 мм. На рентгенограммах удлиняемого сегмента область distraction включала продольные тени, интенсивность которых выше окружающих мягких тканей, однако не достигала плотности губчатого вещества кости и не имела трабекулярного (сетчатого) рисунка (см. рис. 1). Тени локализовались как вблизи опилов костных фрагментов, так и в проекции задней полуокружности distractionного диастаза на всем протяжении. В передней полуокружности оксификация регенерата шла медленнее, что визуально воспринималось как «дефект регенерата» (до 30% случаев). Это можно объяснить нарушением целостности надкостницы по передней поверхности кости при выполнении остеотомии. В ряде случаев такие «дефекты регенерата» достигали 35% его ширины. На рент-

генограммах, выполненных через 4 мес., отмечали признаки хорошей оссификации дистракционных регенератов у 40% пациентов группы контроля. Все пространство между костными фрагментами было представлено интенсивными тенями, сопоставимыми с теневым изображением губчатого вещества кости. Однако наблюдались участки просветления листовидной формы, характеризующие низкую степень оссификации. «Дефект регенерата» в передней полуокружности дистракционного диастаза у этих пациентов был менее выражен и достигал не более 20% ширины поперечника кости и сохранялся после демонтажа аппарата. У 4 пациентов мы наблюдали «арочные» регенераты. Рентгенологическая картина дистракционного регенерата на сроке 5 мес. при замедленном его созревании была близка к рентгенологической картине в 4 мес., несколько выше была интенсивность рентгенологических теней, прежде всего задней полуокружности кости. В случаях, когда дефект сохранялся, аппаратную фиксацию продолжали без динамизации (см. рис. 1).

Компьютерную томографию в группе контроля проводили у некоторых пациентов на сроках 2 и 5 мес., а также перед динамизацией внешней конструкции и после демонтажа аппарата. По данным ис-

следования, выполненного в 2 мес., в группе контроля на горизонтальных КТ-срезах, проведенных через регенерат, отмечали небольшое количество сформированных элементов костной ткани, расположенных в основном ближе к задней полуокружности области дистракции. Они «рыхло» заполняли поперечник томографического среза. Кортикальные слои в этот период были еще не сформированы. Через 5 мес. в группе контроля кортикальный слой не был сформирован полностью ни у одного пациента (рис. 2).

При выполнении ультразвукографии, у пациентов данной группы в 30% случаев отмечено наличие анэхогенных участков в формирующихся регенератах, что отражает отсутствие оссификации.

По данным УЗДГ в группе контроля: на сроке 2 мес. индекс резистентности (RI) определялся на уровне $0,57 \pm 0,05$, что указывает на магистральный тип кровоснабжения в области формирующегося регенерата, периферический кровоток был не развит. Такая же тенденция прослеживалась в этой группе и через 4 мес. $RI = 0,63 \pm 0,04$. В 6 мес. показатели индекса также оставались высокими: $RI = 0,65 \pm 0,12$. У большинства пациентов этой группы показатели индекса резистентности свидетельствовали о недостаточном развитии капиллярной сети в области дистракции.

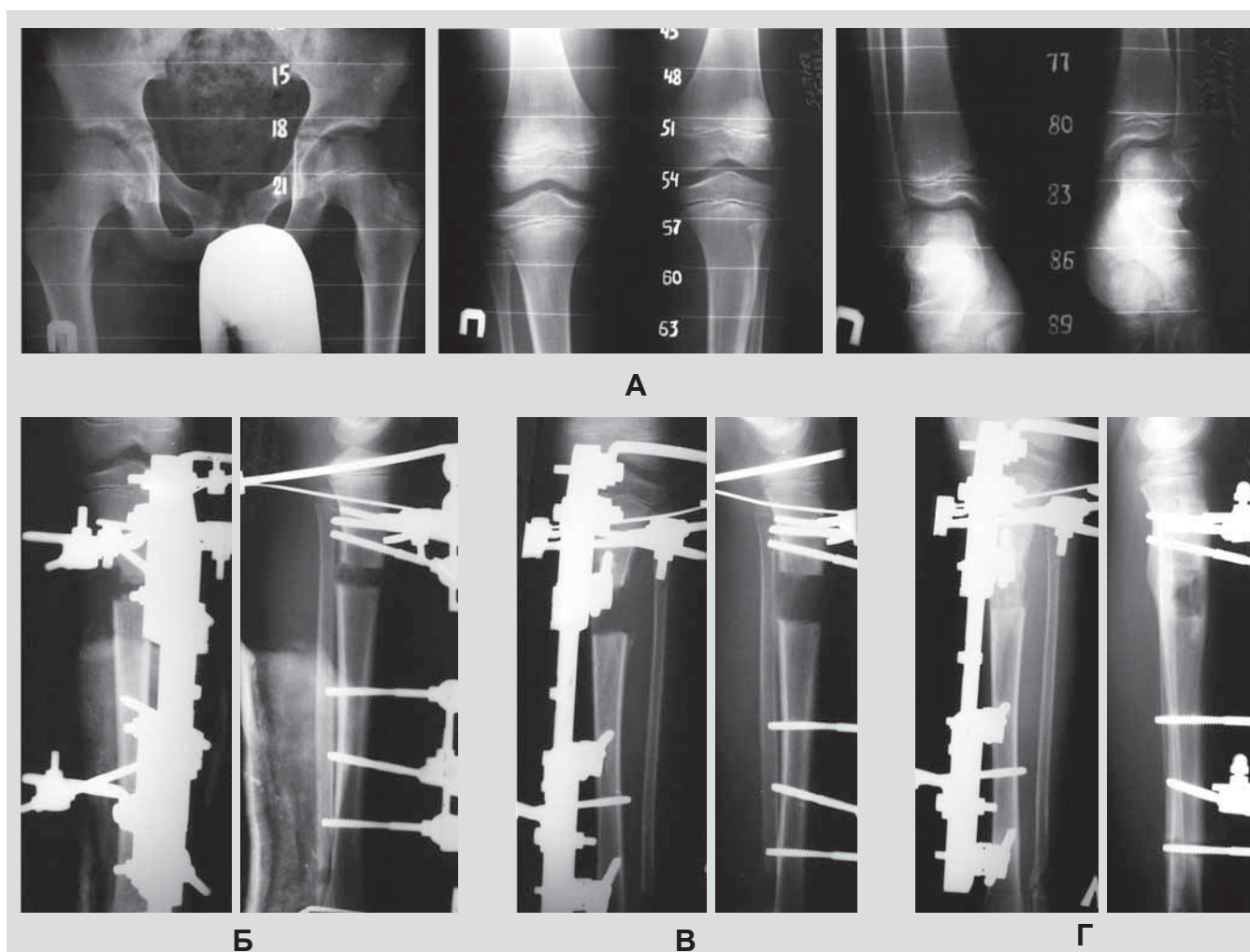


Рис. 1. Рентгенограммы пациента Л. 8 лет с врожденным неравенством длины нижних конечностей (разница в длине 3 см) (контрольная группа): А – рентгенограммы нижних конечностей на сетке Кирдана перед операцией; Б – рентгенограммы (прямая и боковая проекции) левой голени: дистракционный регенерат через 3 нед. после операции; В – то же, 2 мес. после операции; Г – то же, через 5 мес. после операции

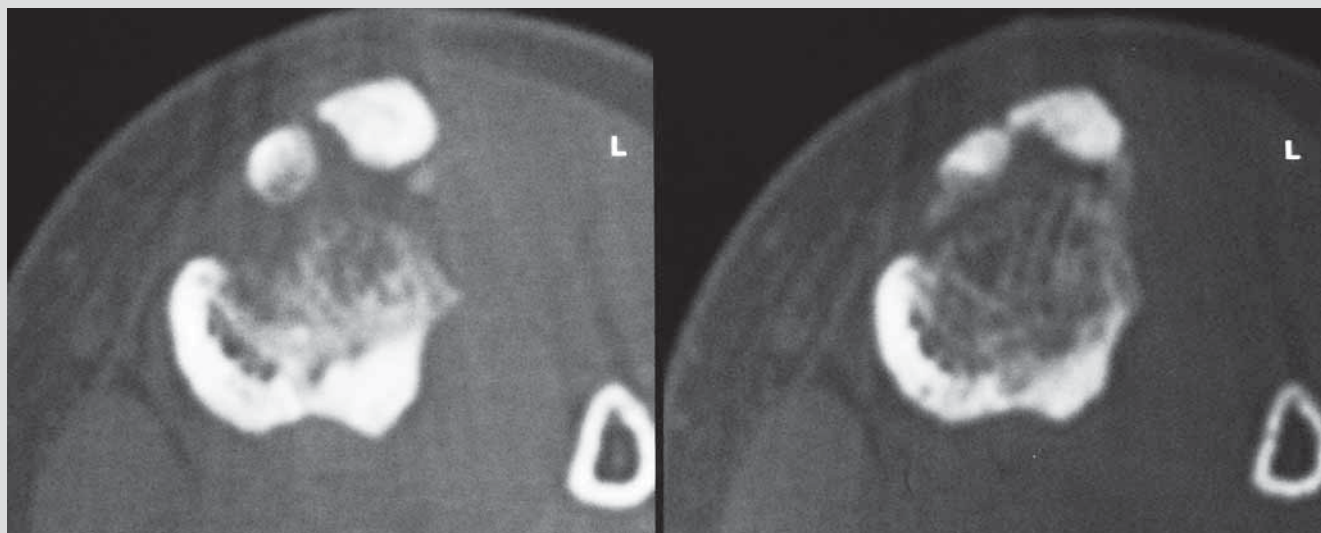


Рис. 2. Компьютерная томограмма пациента Л. 8 лет с врожденным неравенством длины нижних конечностей (разница в длине 3 см.) (контрольная группа): горизонтальные срезы через дистракционный регенерат через 5 мес. после операции

Проводя оценку остеосинтеза у пациентов в группе контроля, обнаружено что, индекс фиксации варьировал от 40,6 до 43,8. Индекс остеосинтеза находился в пределах от 50,7 до 55,9. Сроки фиксации аппарата на 1 см дистракционного регенерата составили от 1,3 до 1,85 мес. Сроки лечения (нахождения в аппарате) составили от 7,5 до 11 мес. (в среднем 9,25 мес.).

У пациентов основной группы (рис. 3) через 3 нед. дистракция составляла от 14 до 18 мм. На рентгенограммах в этот период регенерат был не выражен (см. рис. 3). Через 1 мес. после операции, удлинение сегмента конечности составляло от 20 до 22 мм. На рентгенограммах регенерат был представлен слабыми точечными тенями, локализующимися преимущественно вблизи опилов дистального и проксимального костных фрагментов. В центральных отделах и по передней полуокружности области дистракционного диастаза признаки оссификации отсутствовали. В этот период начинался курс клеточной терапии. На сроке 2 мес. удлинение сегмента составляло от 30 до 50 мм. Рентгенологически, регенераты были неоднородны: наблюдалось чередование участков низкой и высокой рентгенплотности, присутствовал рентггенегативный участок, воспринимаемый как «дефект». Несмотря на сходность рентгенологической картины с регенератами группы контроля, регенераты основной группы имели более выраженную локальную оссификацию (см. рис. 3). Представленное состояние регенератов подтверждается результатом компьютерной томографии. На горизонтальных КТ-срезах через регенераты отмечали точечные участки оссификации, расположенные по всему поперечнику томографического среза. Кортикальные слои в этот период сформированы не были. При проведении ультразвукографии на сроке 2 мес. эхонегативных участков в регенератах не отмечено. Регенераты были однородны на всем протяжении. Через 4 мес. регенераты были представлены интенсивными тенями, заполняющими всю дистракционную область. Выраженных участков просветления в регенератах не выявлено. По плот-

ности рентгенологических теней, формирующиеся регенераты были уже сопоставимы с теневым изображением проксимального и дистального костных фрагментов, а в некоторых участках превосходили их по рентгенологической «плотности». Трабекулярность костного регенерата визуализирована. При ультрасонографии показано, что непрерывность регенератов сохраняется, оссификация проявляется увеличением количества эхопозитивных элементов, костномозговой канал еще не сформирован, а кортикальные слои восстановлены в среднем на 2/3 длины регенератов.

Через 5 мес. на рентгенограммах наблюдались интенсивные рентгенологические тени, заполняющие всю область дистракции между проксимальным и дистальным фрагментами удлиняемой кости. Трабекулярный сетчатый рисунок кости на площади более 3/4 регенерата сформирован. Рентгенологическая плотность регенератов сопоставима с неповрежденной костью. Непрерывность кортикальных пластинок отмечена на всем протяжении сформированной кости (см. рис. 3). На компьютерных томограммах, выполненных в этот период, отмечена выраженная оссификация дистракционных регенератов, непрерывность кортикального слоя вновь сформированной кости. В 3D реконструкции сформированный регенерат практически не отличался от прилежащей кости (рис. 4). Подобная рентгенологическая картина позволяла динамизировать внешнюю конструкцию и планировать демонтаж аппарата (рис. 5).

Показатели периферического кровотока в области дистракционного регенерата у пациентов основной группы, определяемые посредством УЗДГ, оценивали, как и в группе контроля, расчетом индекса резистентности (RI). На сроке 2 мес. RI определялся в пределах $0,35 \pm 0,04$, на сроке 4 мес. — $0,41 \pm 0,05$, на сроке 5,5–6 мес. показатель RI составлял $0,5–0,65$. Динамика подобного изменения индекса на сроках 2 и 4 мес. свидетельствовала о благоприятных условиях для более высоких темпов «созревания» дистракционных регенератов.

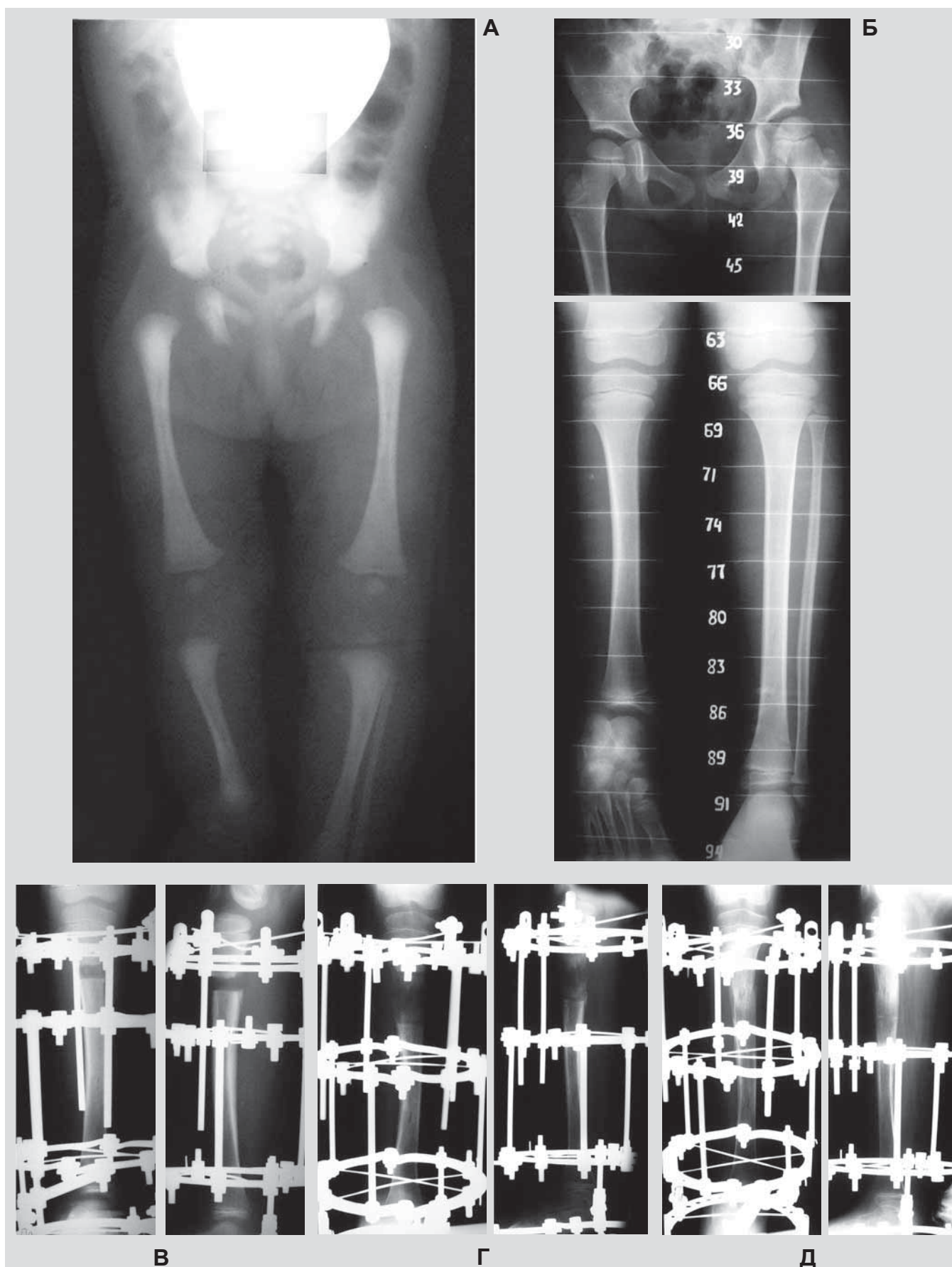
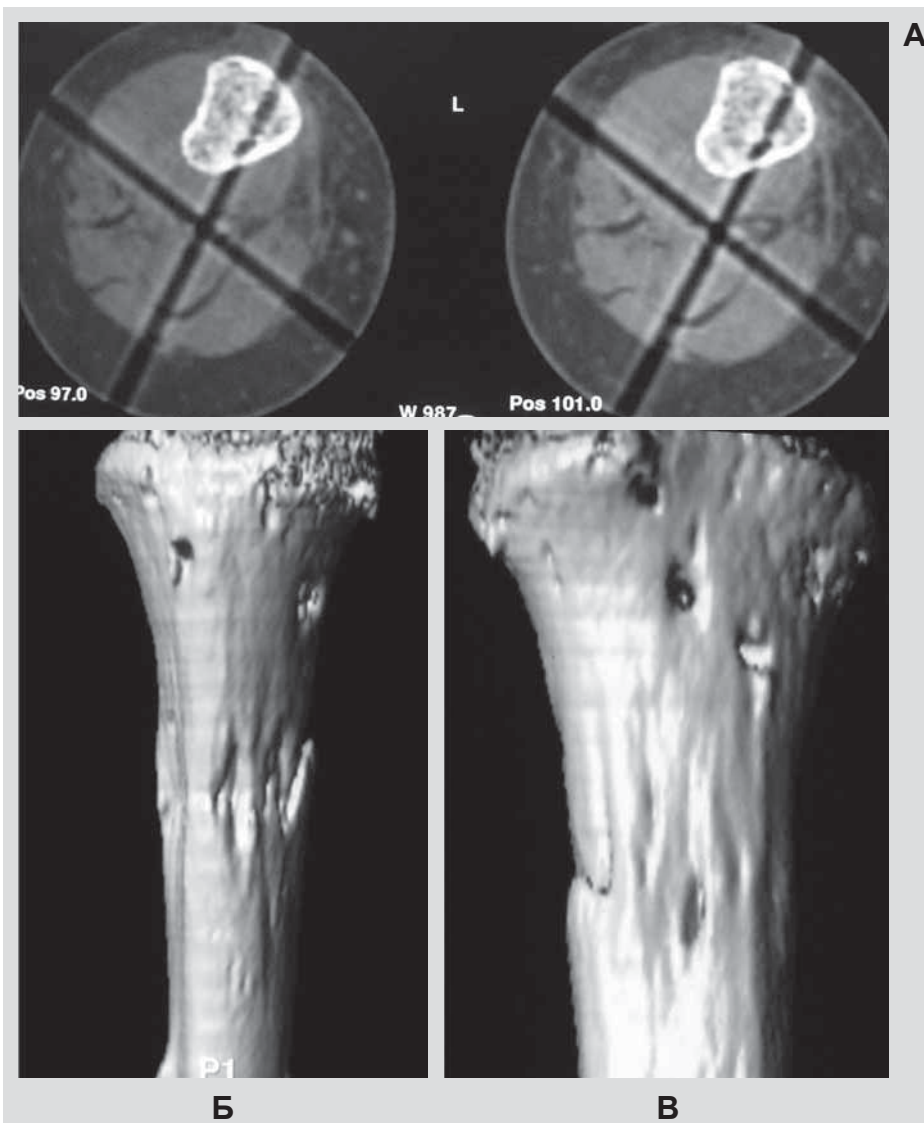


Рис. 3. Рентгенограммы пациентки Б. 6 лет с врожденным неравенством длины нижних конечностей (разница в длине 5 см) (основная группа): А – в возрасте 10 дней; Б – рентгенограммы нижних конечностей на сетке Кирдана перед операцией; В – рентгенограммы (прямая и боковая проекции) правой голени: дистракционный регенерат через 3 нед. после операции; Г – то же, через 2 мес. после операции; Д – то же, через 5 мес. после операции



А

Рис. 4.
Компьютерная томограмма
пациентки Б. 6 лет с врожденным
неравенством длины нижних
конечностей (разница в длине
5 см) (основная группа):
А – горизонтальный срез на уровне
регенерата через 5 мес.
после операции
(до демонтажа аппарата);
Б, В – 3D реконструкция
проксимального метафиза
большеберцовой кости и области
дистракционного регенерата вид
спереди и сзади

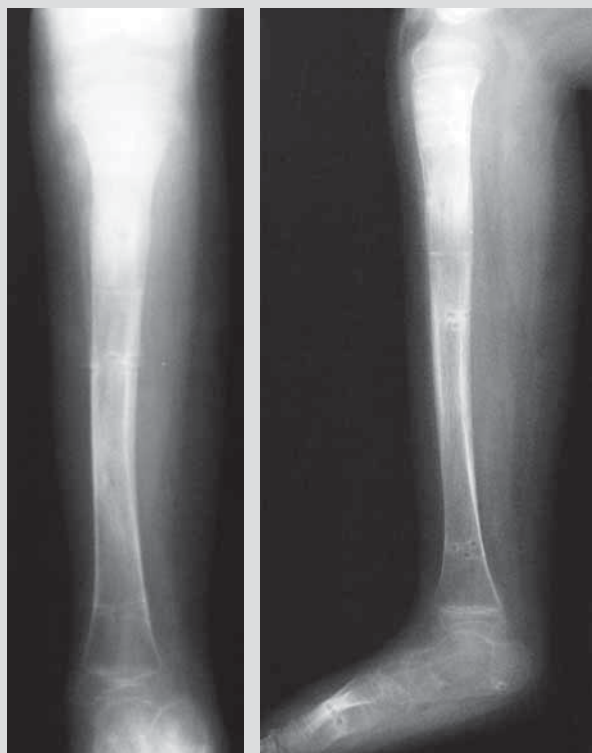


Рис. 5.
Рентгенограммы правой голени пациентки Б. 6 лет
с врожденным неравенством длины нижних конечностей
(разница в длине 5 см) (основная группа).
Аппарат демонтирован через 5 мес. после операции

Показатели остеосинтеза в основной группе составили: индекс фиксации 28,9 до 30,5, индекс остеосинтеза составил от 34,2 до 38,6. Сроки фиксации аппарата были в пределах $1,1 \pm 0,1$ мес. на 1 см компенсации неравенства длины. Продолжительность лечения в этой группе составила от 4,5 до 6,5 мес. (в среднем 5,5 мес.).

После удлинения сегмента нижней конечности наличие тугоподвижности в коленном суставе наблюдали у большинства пациентов обеих групп. При удлинении бедра, помимо натяжения мышц и капсульно-связочного аппарата, это объясняется прохождением спиц и стержней через мягко-тканый массив и фиксацией его к кости, а при удлинении голени — наличием верхней опоры аппарата Илизарова в области сустава. После курса реабилитации, проводимого в среднем в течение 2 мес., объем движений у всех пациентов обеих групп восстанавливался. Следует отметить, что восстановление функции коленного сустава у пациентов из основной группы протекало быстрее и занимало в среднем до 1,5 мес., что связано с меньшим периодом фиксации конечности в дистракционном аппарате.

Через 1 год у всех пациентов обеих групп на рентгенограммах констатированы признаки полного восстановления структуры вновь образованной кости и сформированный костномозговой канал. На сонограммах отмечена сохраняющаяся непрерывность кортикальных слоев. Эхографическая структура мышечных волокон в области дистракции не отличалась от выше и ниже расположенных участков мышц. Необходимости в проведении повторных оперативных вмешательств по пластике регенерата ни в одном случае не потребовалось. У пациентов основной группы сохраняется восстановленное равенство длины конечностей. В контрольной группе, у некоторых пациентов имелся небольшой дефицит длины конечности, связанный с невозможностью полной коррекции, из-за «слабости» дистракционного регенерата, возникшей в процессе удлинения. Болевой синдром у пациентов обеих групп отсутствовал.

С учетом того, что сроки фиксации удлиняемой конечности в аппарате у пациентов, которым проводилась клеточная терапия, сократились, проведение более ранней реабилитации обеспечило лучший и ранний функциональный результат по сравнению с группой контроля. Через 3 года у больных основной группы сохранялась полная функция оперированной конечности. Пациенты не предъявляли жалоб на дискомфорт и боли в области оперированного сегмента. Мышечной гипотрофии удлинённых сегментов не отмечено. Результатом лечения пациенты удовлетворены полностью. Неравенства длины нижних конечностей у пациентов 14–16 лет не отмечено. У детей 8–10 лет, на фоне достаточно активного роста, существенной разницы длины нижних конечностей так же не отмечено, и за период 2 года она составила не более 0,5 см. В группе контроля, у пациентов той же возрастной категории за тот же период неравенство длины составило не менее 2 см.

Следует отметить, что во время проведения лечения с использованием аутогенных клеток и в отдаленном периоде у пациентов основной группы не отмечено каких-либо общесоматических, а также пирогенных и аллергических реакций.

Обсуждение

Целесообразность стимуляции дистракционных регенератов при выполнении хирургической коррекции неравенства длины конечностей врожденного характера показана в ряде работ [4–6, 8]. Для ускорения остеорепаляции авторы использовали как реваскуляризирующие остеоперфорации, так и пластику регенерата ауто- и аллокостью, в том числе фетальной. Сроки лечения при этом сокращались на 15–20% при коррекции неравенства длины от 3,5 до 6 см. Однако ряд факторов и медико-социальных аспектов ограничивали и затрудняли использование технологий, связанных с аллогенными материалами. Использование аутопластических материалов, в частности из крыла подвздошной кости, связано с нанесением дополнительной операционной травмы ребенку. Пластика регенерата ауто- (или алло-) костью сопровождалась выполнением повторного операционного доступа к области дистракции, что ухудшало трофику сегмента.

При использовании аутогенных СККМ вышеуказанных проблем не возникает. Стимуляция остеорепаляции может осуществляться в амбулаторном режиме после выписки пациентов посредством транскутанных инъекций. Подобная форма введения не требует обезболивания, а невысокая плотность еще «незрелого» дистракционного регенерата благоприятствует выполнению процедуры. Использование ориентиров на рентгенограммах в большинстве случаев позволяет проводить введение клеток без рентгенотелевизионной техники.

Применение СККМ для стимуляции репаративного остеогенеза было представлено в ряде исследований [9]. При этом СККМ помещались в область костных повреждений в иммобилизованном виде т.е. на различных матрицах (скаффолдах). При этом сама матрица (например, деминерализованный костный матрикс) могла быть достаточно эффективным стимулятором репаративного остеогенеза. Поэтому оценить (выделить) вклад матрицы и клеток в остеорепаляцию у конкретного пациента практически не возможно. Кроме этого, трансплантированные на матрице клетки оказывались в очаге воспаления со всеми его неблагоприятными характеристиками для СККМ, а именно: ацидоз, гипоксия, наличие многочисленных литических ферментов, выделяющихся при распаде лейкоцитов. Рассчитывать на то, что эти клетки, культивированные до их трансплантации в идеальных условиях, выживут, дифференцируются в остеогенные и начнут полноценно функционировать в этих условиях представляется весьма маловероятным. В тоже время, введение взвеси аутогенных СККМ в экспериментальные костные дефекты после завершения стадии воспаления и начала собственного остеогенеза стимулировали последний, приводя к восстановлению поврежденных костей даже при критических дефектах, т.е. при которых целостность костного органа не восстанавливается самостоятельно [8, 13]. Такой подход лег в основу применения аутогенных СККМ для стимуляции дистракционных регенератов при выполнении хирургической коррекции неравенства длины конечностей врожденного характера у детей [2].

В дистракционных регенератах практически отсутствуют вышеуказанные неблагоприятные воспалительные факторы. Однако у пациентов с диспластическим синдромом может иметь место недостаточно

выраженный остеогенез при компрессионно-дистракционном остеосинтезе.

Аутогенные СККМ трансплантировали в дистракционный регенерат как в период дистракции, так и после ее прекращения. По нашему мнению, они оказываясь в благоприятном микроокружении, включая неминерализованную волокнистую основу, могли проявить свои потенциальные возможности, направленные на репаративный остеогенез [7]. Реализация этих возможностей могла происходить в нескольких вариантах. Во-первых, СККМ, представляя всю совокупность клеток соединительнотканых дифферонов (в том числе остеобластического) на различных стадиях дифференцировки, могли дифференцироваться в остеогенные клетки, пополнив собой пул местных остеобластов, участвующих в построении первичной (ретикулофиброзной) костной ткани [14, 15]. Во-вторых, часть пересаженных стромальных клеток могла погибнуть и далее выступать в роли своеобразного фидера («продукта питания») для оставшихся культивированных и резидентных остеогенных клеток, способствуя пролиферации, дифференцировке и их более активной жизнедеятельности. В-третьих, часть введенных клеток могла некоторое время переживать (функционировать) в области регенерации, выделяя многочисленные факторы роста, оказывая тем самым стимулирующее влияние на все резидентные клетки остеобластического дифферона. По мере формирования и созревания регенерата эти клетки погибают.

Полученные результаты с клинической точки зрения убедительно свидетельствуют о выраженном стимулирующем эффекте СККМ в отношении фор-

мирования и «созревания» дистракционных регенератов у детей при хирургической коррекции неравенства длины конечностей. Этот эффект проявился прежде всего в значительном сокращении сроков оксификации формирующихся дистракционных регенератов удлиняемых конечностей, по сравнению с группой контроля, что позволило значительно раньше демонтировать дистракционный аппарат и, следовательно, сократить или исключить возможные осложнения, связанные с длительной фиксацией. В свою очередь, более раннее освобождение оперированных конечностей от внешних фиксирующих конструкций дало возможность полной осевой нагрузки и проведения реабилитации. В результате, функциональное восстановление конечностей пациентов после применения местного введения клеточной взвеси опережало таковое у пациентов в контрольной группе, что положительно сказывалось на качестве жизни и последующей социальной адаптации оперированных детей. В дальнейшем, при росте ребенка из основной группы, удлинённый сегмент конечности после проведения хирургической коррекции неравенства длины, в меньшей степени отставал в своем развитии, чем у пациентов группы контроля. Очевидно, что применение СККМ оказало стимулирующее действие на рост сегмента корригируемой конечности, приближая темпы ее роста к физиологическим.

Таким образом, результат применения СККМ позволяет сделать вывод о перспективности их дальнейшего использования для стимуляции репаративной костной регенерации с учетом закономерностей ее течения.

Литература:

- Илизаров Г.А., Каплунов А.Г., Калякина В.И. Оперативное удлинение нижних конечностей по Илизарову. Курган 1979; 23.
- Миронов С.П., Омеляненко С.П., Кожевников О.В. и др. Использование клеточной технологии при хирургической коррекции врожденного неравенства длины нижних конечностей у детей. Вестник травматол. и ортопед. им. Н.Н. Приорова 2011; 1: 3–9.
- Остеосинтез. Руководство для врачей под ред. С.С. Ткаченко. Л.: Медицина 1987; 272.
- Петров М.А. Прогнозирование и лечение нарушений репаративного остеогенеза у детей. Дисс. канд. мед. наук. Москва 2007.
- Зеленецкий И.Б., Глебов А.Ю., Вольвач Ю.И. Лечение детей с ортопедической патологией методом чрескостного остеосинтеза. Травма 2008; 9(2): 189–92.
- Малахов О.А., Кожевников О.В. Неравенство длины нижних конечностей (клиническая картина, диагностика, лечение). М.: Медицина 2008; 352.
- Климовицкий В.Г., Гринь В.К., Оксонец В.М. и др. Механизмы влияния мезенхимальных стволовых клеток на репаративный остеогенез. Травма 2009; 10(2): 123–33.
- Миронов С.П., Омеляненко С.П., Ильина В.К., и др. Тканевые и клеточные технологии управления репаративным остеогенезом. Кремлевская медицина (клинический вестник) 2007; 1: 48–52.
- Щепкина Е.А., Кругляков П.В., Соломин Л.Н. и др. Трансплантация аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на деминерализованном костном матриксе при лечении ложных суставов длинных трубчатых костей. Клет. трансплантол. ткан. инж. 2007; 2(3): 67–74.
- Qi M., Hu J., Zou S. et al. Mandibular distraction osteogenesis enhanced by bone marrow mesenchymal stem cells in rats. J. Craniomaxillofac. Surg. 2006; 34(5): 283–9.
- Shao Z., Liu B, Peng Q. et al. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in the rabbit mandible. Plast. Reconstr. Surg. 2007; 119(2): 500–7.
- Kitoh H., Kitakoji T., Tsuchiya H. et. al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis a preliminary result of three cases. Bone 2004; 35(4): 892–8.
- Омеляненко Н.П., Малахов О.А., Сухих Г.Т. и др. Исследование влияния эмбриональной костной ткани на репаративную регенерацию кости. Бюл. эксперимент. биологии и медицины 2000; 10: 469–74.
- Омеляненко Н.П., Миронов С.П., Денисов-Никольский Ю.И. и др. Репаративная регенерация. В кн.: Актуальные проблемы теоретической и клинической ортоартрологии. М.: ОАО «Типография «Новости» 2005: 239–74.
- Омеляненко Н.П., Слущкий Л.И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). М.: Издательство «Известия»; 380.

Поступила 20.05.2011