

УДК: 616.71-003.93-018.46-089.843.001].001.6

РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КУЛЬТИВОВАНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ В МОДЕЛЬОВАНИЙ ДЕФЕКТ

Шимон В.М., Шерегій А.А.

Ужгородський національний університет, медичний факультет, кафедра загальної хірургії, травматології та ортопедії, оперативної хірургії та судової медицини, м. Ужгород

РЕЗЮМЕ: в роботі представлені результати експерименту отримані після трансплантації культивованих стромальних клітин кісткового мозку в зону змодельованого дефекту стегнової кістки білих лабораторних щурів. Проведені гістологічні дослідження на етапах експерименту свідчать про ефективність даної методики з погляду на репаративну регенерацію у порівнянні з контрольною групою тварин.

Ключові слова: репаративна регенерація кісткової тканини, змодельований дефект стегна, стромальні клітини кісткового мозку

Вступ. Репаративна регенерація кісткової тканини – одна із найактуальніших проблем ортопедії та травматології. Прогрес у розвитку травматології та ортопедії як науки пов'язаний здебільшого з розробкою та вдосконаленням різноманітних технологічних конструкцій для з'єднання кісткових відламків. У цьому напрямку досягнуті певні успіхи, однак ряд питань, пов'язаних із так званою "остеогенною недостатністю", залишаються невирішеними [4, 5, 7]. Експериментальні дослідження по даній проблемі ведуться в різних напрямках. Одним із таких напрямків є розробка біологічно активних речовин (факторів росту), які є стимуляторами остеогенезу, серед яких основна роль у цих процесах належить кістковим морфогенетичним білкам [6]. На сьогоднішній день активно розвивається новий напрям регенераторної медицини – клітинна та тканинна інженерія [9, 10]. Клітинні технології включають у себе розробку методів отримання клітинних культур, оцінку їхнього впливу на репаративний остеогенез, а також технології їх застосування в практичній медицині.

У літературі найбільш широко представлені розробки з отримання та культивування аутологічних стромальних клітин кісткового мозку [11]. Дослідники пов'язують можливість застосування стромальних клітин кісткового мозку при їхній трансплантації на біосумісних носіях [2, 3, 12, 13]. Клітини на матрицях використовують для відновлення проблемних пошкоджень кістки – багатотламкові переломи, поєднані з обширними дефектами кістки, дефекти кістки після остеомієліту, резекції новоутворів тощо.

В даний час, у зв'язку із фундаментальними дослідженнями в галузі репаративного остеогенезу, встановлено, що існує багато факторів ризику, здатних порушити протікання цього процесу. Серед них – стан кісткової тканини мешканців "проблемних" районів із дефіцитом йоду, збільшенням вмістом фтору, радіаційним фоном тощо. Доведена низька регенераторна активність у пацієнтів із цукровим діабетом, при нейрофіброматозі та інших захворюваннях. У зв'язку з цим, дослідники звертають увагу на біологічні стимулятори остеогенезу, а саме – на застосування культивованих остеопрогеніторних клітин.

Мета дослідження: в експерименті на білих лабораторних щурах вивчити регенерацію кістки при трансплантації культивованих стромальних клітин кісткового мозку.

Матеріали та методи. Клітини кісткового мозку в ході експерименту отримували в стерильних умовах із каналу стегнової кістки щурів-донорів, шляхом вимивання розчином Хенкса. Клітини осаджали шляхом центрифугування при 1000 об/хв протягом 10 хв., відмивали в розчині Хенкса, ресуспензували в середовищі ДМЕМ з додаванням 20 % фетальної телячої сироватки, 2 МО L-глутаміна і 50 мкг/мл гентаміцину. Кількість виділених клітин визначали шляхом підрахунку в камері Горяєва. Клітини сіяли у флакони для культивування в концентрації 2×10^6 на cm^2 дна флакона. Через добу культуральне середовище з клітинами, що не прикріпилися, зливали, клітини промивали розчином Хенкса (два-три рази) та додавали свіже середовище для культивування (ДМЕМ з L-глутаміном, 10% телячої сироватки, 100 МО/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину). Клітини культивували в CO_2 – інкубаторі при температурі $+37^\circ \text{C}$, в середовищі з 5 % CO_2 та 95% вологості. Середовище міняли кожні дві доби. Клітини стромі кісткового мозку наділені низькою проліферативною активністю та утворюють колонії фіброластоподібних клітин на дні флакона через 12-14 діб. Для створення умов остеогенного диференціювання в культуральне середовище додавали 0,285 мл аскорбінової кислоти, 10 мл бета-гліцерофосфату, 10^{-7} МО дексаметазона.

Для трансплантації клітини знімали на 14 добу за допомоги 0,25 % розчину трипсину, який інактивували культуральним середовищем з сироваткою та осаджали клітини центрифугуванням. Для трансплантації клітини ресуспензували в 0,95% розчині хлориду натрію з 5% сироваткою білого щура.

Робота з тваринами проводилась у відповідності з правилами гуманного відношення до тварин. Щурам в умовах асептики при використанні внутрішньозового наркозу (аміназин – 40мг/кг та кетамін – 50 мг/кг) в метадіафізарній ділянці дистального відділу стегнової кістки (не вскриваючи капсулу суглобу) відтворювали наскрізний дефект, використовуючи стоматологічний бор діаметром 2 мм.

Дефект промивали 0,95% розчином хлориду натрію. Рану зашивали. На третю добу підготовану клітинну суспензію в кількості 6×10^6 /0,1 мл вводили (через шкірно) в ділянку дефекту за допомогою шприца. Третя доба протікання процесу регенерації кістки у щурів відповідає стадії проліферації та диференціації клітин. Контрольним тваринам вводили середовище для культивування без клітин.

Матеріал дослідження забирали на 7 та 14 добу. Тварин виводили з експерименту шляхом передозування ефіру.

Використовували цитологічні та гістологічні методи. Для контролю одне із скелець культивованих клітин було забарвлено азур-еозином. Фрагменти стегнової кістки щурів із травматичним пошкоджен-

ням були підготовані для дослідження за стандартною методикою [8]. Зрізи забарвлювали гематоксином та еозином, пікрофуксином за Ван Гізон та досліджували під мікроскопом MICROS. Морфометричні дослідження тканин регенерату проводили на 14 добу за методом Автандилова Г.Г. [1].

Результати досліджень та їх обговорення. Більшість культивованих клітин розміщувались на предметних скельцях невеликими скупченнями, мала фібробластоподібну видовжену форму з довгими відростками. Невеликих розмірів, округлі ядра клітин оточені вузьким обідком цитоплазми. Хроматин ядра був рихлим (рис. 1). Життєздатність клітин (при забарвленні трипановим синім) складала 90 %.

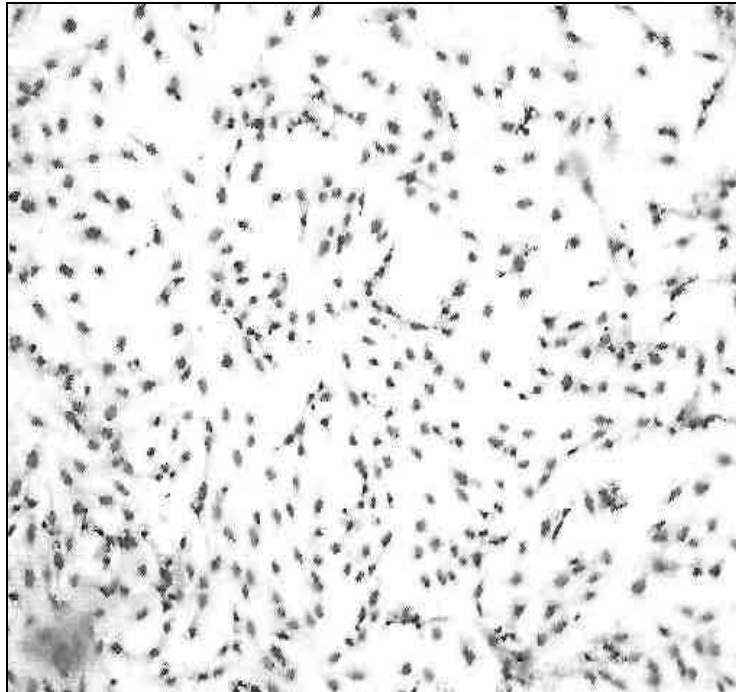


Рис. 1. Культура стромальних клітин кісткового мозку щурів досліджуваної групи. Забарвлення азурII-еозином. Зб. X100.

Після трансплантації культивованих клітин в зону дефекту стегнової кістки тварини на всіх термінах експерименту навантажували оперовану кінцівку і були активними.

Мікроскопічно на 7 добу регенерати у ділянці дефекту дослідних тварин відрізнялися від контрольних. Так, у регенераті дослідних тварин переважали поля остеїда та незрілі кісткові трабекули. Лише невеликі площі займала фіброретикулярна тканина. В кісткових дефектах контрольних тварин обширні площі регенерату були представлені фіброретикулярною тканиною остеобластичного типу.

На 14 добу ділянка дефекту у дослідних тварин була заповнена мілкопетлистою сіткою кісткових трабекул, між якими розміщувалась фіброретикулярна тканина. Новоутворені кісткові трабекули характеризувалися високою щільністю остеоцитів. Кістковий регенерат був щільно сполучений з ма-

теринською кісткою, в якій були присутні сліди посттравматичних порушень: безклітинні території з нерівномірно базофільними лініями склеювання (рис. 2). Над дефектом сформувався періост із вузького рівномірного фіброзного шару (рис. 3). При морфометричному дослідженні встановлено, що новоутворена кісткова тканина займала $62,71 \pm 3,16$ % території дефекту, а площа фіброретикулярної тканини складала $26,51 \pm 1,83$ %.

У регенератах дефекту стегнової кістки тварин контрольної групи, на відміну від дослідних тварин, окрім новоутворених кісткових трабекул (територія $15,7 \pm 1,24$ %) присутні обширні поля ($73,98 \pm 4,12$ % від площі дефекту) фіброретикулярної тканини з вираженою остеобластичною реакцією на межі з кістковими трабекулами (рис. 2). Зміни в материнській кістці були ідентичні описаним для тварин досліджуваної групи.

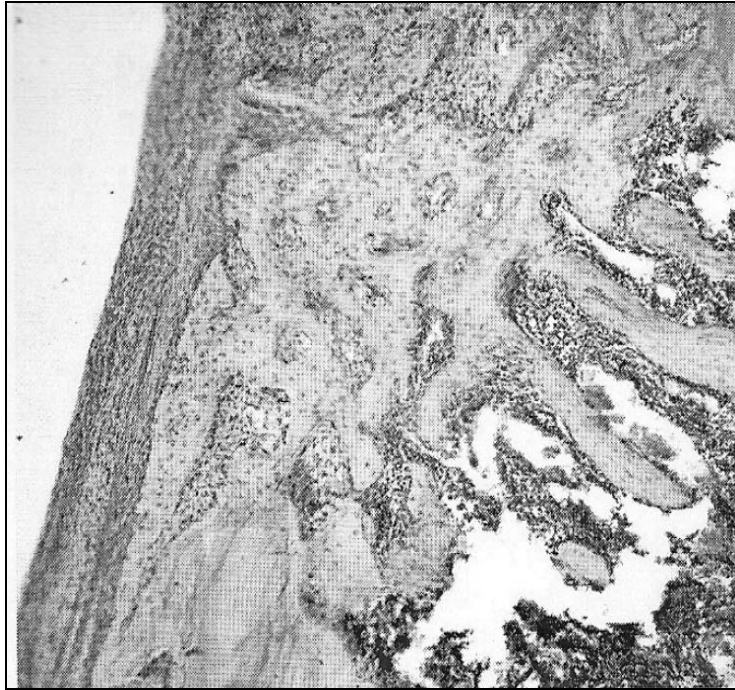


Рис. 2. Ділянка регенерації кістки в зоні дефекту тварин досліджуваної групи. Новоутворені кісткові трабекули. Сформований періост над регенератом. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б. X 200.



Рис. 3. Ділянка регенерації в зоні дефекту тварин контрольної групи. Масив фіброретикулярної тканини поруч із новоутвореними кістковими трабекулами. Забарвлення гематоксилін-еозином. 3б. X 200.

Висновки. Трансплантація культивованих стромальних клітин кісткового мозку в кістковий дефект стимулює репаративний остеогенез.

Стромальні клітини кісткового мозку є на-

дійним джерелом остеогенезу, недостатність якого часто спостерігається при багатоуламкових переломах, поєднаних з обширними дефектами кістки після остеомієліту, резекції новоутворів тощо.

ЛІТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 381 с.
2. Волков А.В. Синтетические биоматериалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии / А.В. Волков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2005. — № 2. — С. 43-45.
3. Волков А.В. Тканевая инженерия: новые перспективы развития медицины / А.В. Волков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 1. – С. 57-63.
4. Деев Р.В. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии / Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш, Р.М. Тихолов // Травматология и ортопедия России. – 2007. – Вып. 46, № 4. – С. 18-30.
5. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации (сообщение 1) / Корж Н.А., Дедух Н.В. // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 77-84.
6. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Методы тканевой терапии и генной инженерии (сообщение 6) / Н.А. Корж, Н.В. Дедух, Н.А. Ашукина // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 3. – С. 93-99.
7. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Системные факторы, влияющие на заживление перелома (сообщение 3) / Корж Н.А., Дедух Н.В., Никольченко О.А. // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 2. – С. 93-99.
8. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 542 с.
9. Krebsbach, P.H. Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Therapeutics for Craniofacial Regeneration / P.H. Krebsbach, P.G. Robey // J. Dent. Edu. – 2002. – Vol. 66, № 6. – P. 766-773.
10. Langer, R. Tissue engineering / R. Langer, J.P. Vacanti // Science. – 1993. – Vol. 260, № 5110. – P. 920-926.
11. Mankani, M.H. In vivo bone formation by Human marrow stromal cells: Reconstruction of the mouse calvarium and mandible / M.H. Mankani, S.A. Kuznetsov, R.M. Wolfe et al. // Stem cells. – Vol. 24, № 9. – P. 2140-2149.
12. Ohgushi H. Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics / H. Ohgushi, Y. Dohi, T. Yoshikawa, S. Tamai et al. // J. Biomed. Mater. Res. – 1996. – Vol. 32, № 30. – P. 341-348.
13. Vacanti, J.P. Editorial: tissue engineering: a 20-year personal perspective / J.P. Vacanti // Tissue Eng. – 2007. – Vol. 13, № 2. – P. 231 -232.

SUMMARY

BONE REGENERATION UPON TRANSPLANTATION CULTIVATED MARROW CELLS INTO THE PROTOTYPED DEFECT

Shymon V.M., Shereghy A.A.

In this work described our experiment and the results after transplantation of cultivated marrow stromal cells into the prototyped defect zone of metadiaphysis of the laboratory rats' thighbone. Histological studies, carried out on different stages of the experiment are indicate for efficiency given this method, considering reparative osteogenesis' processes in comparison with checking group of the rats.

Keywords: reparative regeneration, prototyped defect, stromal cells of the marrow