

УДК: 616.721.1.089

© Юхта М.С., Волкова Н.О., Гончарук О.І., 2013

ДОЗОЗАЛЕЖНИЙ ТЕРАПЕВТИЧНИЙ ЕФЕКТ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ПРИ ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗМІНАХ МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКІВ Юхта М.С., Волкова Н.О., Гончарук О.І.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Юхта М.С., Волкова Н.О., Гончарук О.І. Дозозалежний терапевтичний ефект мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин при дегенеративних змінах міжхребцевих дисків // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 44-46.

За допомогою гістологічних методів дослідження показано, що кріоконсервованій алогенній культурі МСК кісткового мозку властивий дозозалежний терапевтичний ефект у разі їх локального введення у дегенеративно змінений міжхребцевий диск.

Ключові слова: міжхребцевий диск, дегенеративно-дистрофічне ушкодження, кріоконсервування, клітинна терапія, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, доза.

Юхта М.С., Волкова Н.А., Гончарук Е.И. Дозозависимый терапевтический эффект криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при дегенеративных изменениях межпозвонковых дисков // Украинский морфологический альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 44-46.

С помощью гистологических методов исследования показано, что криоконсервированной аллогенной культуре МСК костного мозга присущ дозозависимый терапевтический эффект при их локальном введении в дегенеративно измененный межпозвонковый диск.

Ключевые слова: межпозвонковый диск, дегенеративно-дистрофическое повреждение, криоконсервирование, клеточная терапия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, доза.

Iukhta M. S., Volkova N.A., Goncharuk E.I. Dose-dependent therapeutic effect of cryopreserved bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells in intervertebral disc degenerative changes // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 44-46.

Histologically there was shown that locally introduced into degenerated intervertebral disc cryopreserved allogeneic bone marrow-derived MSCs possessed a dose-dependent therapeutic effect.

Key words: intervertebral disc, degenerative damage, cryopreservation, cell therapy, multipotent mesenchymal stromal cells, dose.

Вступ. Дегенеративно-дистрофічні захворювання хребта залишаються не тільки актуальною медичною, а й соціально-економічною проблемою будь-якої к раїни світу. Болі у спині, обумовлені цією патологією, займають п'ятому вагу серед причин звертань в амбулаторній практиці [1]. Лікування таких хворих трудомісткий та довготривалий процес, який в 50% випадків закінчується рецидивом на протязі першого року після закінчення курсу консервативної терапії [2]. Одним з перспективних шляхів лікування дегенеративно-дистрофічних змін міжхребцевих дисків (МХД) може стати залучення до медичної практики сучасних досягнень клітинної біології, а саме застосування кріоконсервованих алогенних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (КрМСК). Їх перевагами є:

- можливість отримувати МСК від молодих здорових донорів у достатній кількості з високими показниками здатності до проліферації та спрямованого диференціювання, що дозволяє не травмувати пацієнта;
- можливість проведення ретельного мікробіологічного контролю;
- застосування існуючих протоколів кріоконсервування МСК дозволяє їх використання у будь-який потрібний для лікування момент і забезпечує високу якість кріоконсервованого клітинного препарату.

Відомо, що МСК, як і більшості клітинних препаратів, властивий дозозалежний ефект, тому

доза трансплантованих клітин може бути вирішальним фактором їх терапевтичної ефективності [3]. В літературі існує відносно невелика кількість робіт, цілеспрямованих на дослідження терапевтичного ефекту КрМСК в залежності від дози трансплантованих клітин. Тому експериментальне визначення ефективної дози КрМСК для оптимальної корекції патологічних станів, в тому числі дегенеративно-дистрофічних порушень МХД, на сьогодні є актуальною проблемою.

Метою роботи було визначення оптимальної дози КрМСК для корекції дегенеративно-дистрофічних порушень МХД в експерименті.

Матеріали і методи дослідження. Усі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, а також «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими II Національним конгресом по біоетиці (2004 р., Україна).

МСК виділяли із резеційованих фрагментів стегнових кісток щурів (n=7, масою 100-150 г) шляхом вимивання за допомогою розчину Хенксу з наступним пропусканням крізь голки діаметром, що зменшувався. Суспензію центрифугували при 1500 об/хв (834 g) протягом 5 хв. Осад ресуспендували та висівали на культуральні флакони (РАА, Австрія) зі щільністю 10^3 клітин/см². Культиву-

вання проводили у стандартних умовах (37°C, 5% CO₂) з використанням інкубатора Sanyo (Японія) за методом адгезії стромальної фракції до культурального пластику з наступним видаленням неадгезивних клітин. Живильне середовище культивування, що містило середовище IMDM (Sigma, США), 10% ембріональну сироватку (ЕС) великої рогатої худоби (HyClone, США), гентаміцин (150 мкг/мл) (Фармак, Україна) та амфотеріцин Б (10 мкг/мл) (Sigma, США), змінювали кожні 3 доби.

Для криоконсервування культури МСК використовували 2-х етапну програму (1°C/мін до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот) під захистом 10% ДМСО з додавання 20% ЕС на середовищі культивування. Зразки зберігали в умовах низькотемпературного банку не менш ніж 3 міс. Відігрівали на водяній бані (40°C) з наступним видаленням криопротектора шляхом центрифугування.

Експериментальне дослідження проведене на 28 щурах масою 350±50 г. Всім тваринам спочатку моделювали компресійне дегенеративно-дистрофічне пошкодження МХД [4]. На 60 добу дію компресії припиняли та під кетаміновим наркозом робили середній розтин шкіри хвоста з дорсальної сторони безпосередньо над МХД С_{VI-VII}, забезпечували гемостаз та тупим шляхом здійснювали скелетування дорсальної поверхні цього диску. Подальші маніпуляції різнилися в залежності від групи експериментальних тварин. Тваринам *I групи* (n=7), які слугували контролем, проводили лише скелетування. Тваринам *II групи* (n=7) формували ложе необхідного розміру, в яке поміщали колагенову губку (Ankerpharm, Німеччина) розміром 0,8×0,8×0,5 см, а на неї наносили 0,25 × 10⁶ КрМСК в 0,1 мл розчину Хенкса (РАА, Австрія) (0,7 × 10⁶ клітин/кг маси тіла тварини). Тваринам *III групи* (n=7) за тих же умов вводили 0,5 × 10⁶ КрМСК (1,4 × 10⁶ клітин/кг маси тіла тварини), а тваринам *IV групи* (n=7) – 1,0 × 10⁶ КрМСК (2,8 × 10⁶ клітин/кг маси тіла тварини). Витримавши 1-2 хвилини, рану ушивали вузловими швами і дезінфікували. З експерименту тварин виводили на 30 добу після терапії.

Оцінку змін, що відбувалися, проводили за допомогою гістологічних методів дослідження, для чого брали частину хребта на рівні С_{IV-X}. Виготовлення целоїдинових зрізів та їх фарбування гематоксином та еозином, пікрофуксином по Ван-Гізону і толуїдиновим синім проводили згідно з методикою [5]. Зрізи досліджували на світловому мікроскопі Carl Zeiss з цифровою фотокамерою Cannon EOS 30D.

Результати досліджень та їх обговорення.

Гістологічна картина контрольної групи тварин характеризувалася характерною для МХД морфологією з ознаками дегенеративно-дистрофічного пошкодження (рис. 1А). Фіброзне кільце (ФК) мало ламелярну організацію зі звивистим ходом волокон, які були розволокнені і подекуди фрагментовані. У ФК визначалися розшарування пластин колагенових волокон, центральні тріщини та щілини, щільність фіброхондроцитів була зниженою, з дорсальної сторони визначалися ділянки повної відсутності клітин.

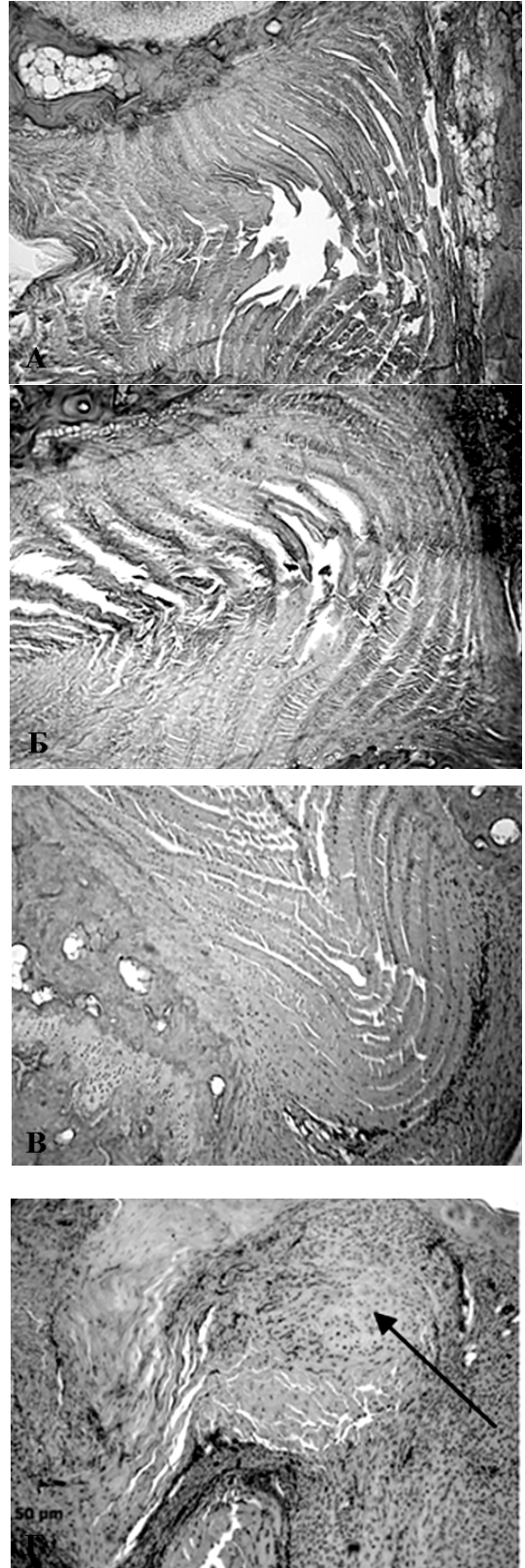


Рис.1: Дорсальна частина ФК МХД С_{VI-VII} щура (30 доба дослідження): Мікрофото, забарвлення гематоксином і еозином, × 120. А – контрольна група. Б – введення суспензії КрМСК в дозі 0,25 × 10⁶. В – введення суспензії КрМСК в дозі 0,5 × 10⁶. Г – введення суспензії КрМСК в дозі 1,0 × 10⁶ (стрілкою вказано осередок хондроїду, що межує з МХД С_{VI-VII}).

Фіброхондроцити розташовувалися ланцюжками між пучками колагенових волокон і були оточені базофільним неволокнистим міжклітинним матриксом. Драглисте ядро (ДЯ) було деформоване і зміщено у вентральний бік МХД, щільність нотохордальних клітин в ДЯ також була пониженою, а синцитій фрагментований.

В гістологічних препаратах тварин, яким в зону дефекту (С_{CVI-VII}) на колагеновій губці вводили $0,25 \times 10^6$ КрМСК, спостерігали лише незначний терапевтичний ефект. Хід колагенових волокон у внутрішніх відділах ФК з дорсальної сторони залишався порушеним, вони мали звисту форму, були розволокненні і подекуди фрагментовані. Серед них переважно в центрі ФК спостерігались досить великі щільні, навкруги яких колагенові волокна були різко оксифільні та не містили клітин. На респі ділянок ФК з дорсальної сторони МХД С_{CVI-VII} відбувалося збільшення клітинності (у першу чергу за рахунок зовнішніх відділів ФК та зон прилеглих до апофізів хребців) (рис. 1Б). З вентральної сторони ФК залишалися деструктивні тріщини, розволокнення колагенових волокон та гіпоклітинні ділянки. ДЯ було фрагментоване та містило велику кількість клітин з гіпохромними ядрами. По краям диску локалізувались інфільтрати із фібробластоподібних клітин. Структура решти досліджених дисків істотно не відрізнялася від МХД контрольних тварин.

При введенні КрМСК у дозі $0,5 \times 10^6$ терапевтичний ефект був більш вираженим порівняно з меншою дозою клітин ($0,25 \times 10^6$ КрМСК). Визначалася позитивна динаміка відновлення структури МХД С_{CVI-VII} (рис. 1В). ФК мало пластинчасту організацію з радіальним ходом пучків колагенових волокон, впродовж та всередині яких розташовувались фібробластоподібні витягнуті клітини із щільними овоїдними ядрами. Щільність клітин була високою, хоча центральні його ділянки з дорсальної сторони залишалися безклітинними. В частині препаратів по центру ФК локалізувались деструктивні щільні. Відмічалось незначне розволокнення та фрагментація пучків колагенових волокон. ДЯ було фрагментоване та містило велику кількість клітин з гіпохромними ядрами. По краям диску локалізувались невеликі інфільтрати із фібробластоподібних клітин. Структура решти досліджених дисків істотно не відрізнялася від контролю з самовідновленням.

При введенні КрМСК в дозі $1,0 \times 10^6$ терапевтичний ефект мав найбільш виражений характер, але в 4 з 7 досліджених препаратів по краю МХД С_{CVI-VII} спостерігалось формування осередків хондроїду різної величини, оточених фіброзною тканиною (рис. 1Г). Клітинний склад хондроїду був представлений крупними, яскраво забарвленими хрящовими клітинами з центрально розташованими крупними овальними гіпохромними ядрами. При фарбуванні толуїдиновим синім центральні ділянки таких осередків набували метакроматичного забарвлення. В

подібних дослідженнях по репарації пошкоджень сухожильків *in vivo* [6, 7] надлишкова доза МСК призводила до активізації хондро- та остеогенезу у місці трансплантації. Ймовірно, що отриманий у наших дослідженнях аналогічний ефект також пов'язаний зі збільшенням кількості трансплантованих клітин.

Висновки. Таким чином, КрМСК кістково-го мозку властивий дозозалежний терапевтичний ефект у разі їх локального введення (на колагеновій губці) у дегенеративно змінений МХД. В лінійці відпрацьованих доз найменш виражений результат спостерігався при застосуванні КрМСК у кількості $0,25 \times 10^6$ клітин. Застосування КрМСК у дозі $1,0 \times 10^6$ призводило до наявності майже у половині випадків побічних ефектів у вигляді формування осередків хондроїду у місці введення. Оптимально ефективною стала доза $0,5 \times 10^6$ КрМСК, застосування якої давало гарний терапевтичний результат та не викликало побічних ефектів. Перспективою подальших досліджень є вивчення динаміки відновлювальних процесів в дегенеративно зміненому МХД після локального введення КрМСК у дозі $0,5 \times 10^6$.

Автори висловлюють подяку і зберігають пам'ять про ініціатора і натхненника цієї роботи акад. НАН України Грищенко В.І.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Bogduk N. Medical management of acute and chronic low back pain. Bogduk N., McGuirk B. – Amsterdam: Elsevier, 2002. – 224 p.
2. Hestbaek L. Low back pain: what is the long-term course? A review of studies of general patient populations / Hestbaek L., Leboeuf-Yde C., Manniche C. // European Spine Journal. – 2003. – Vol. 12(2). – P. 149-65.
3. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. / Sessarego N., Parodi A., Podestà M. et al. // Haematologica. – 2008. – 93(3):339-46.
4. Патент № 73383 Україна МПК (51) G09B23/28 (2006.01). З-но: 20.02.2012 Опубл.: 25.09.2012 Бюл.№18, 2012 р. Спосіб моделювання дегенеративно-дистрофічного пошкодження міжхребцевого диску. Гончарук О.І., Волкова Н.О., Юхта М.С.
5. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техникой/Волкова О.В., Елецкий Ю.К. – М.: Медицина, 1982. – 304 с., ил.
6. Effects of cell-to-collagen ratio in stem cell-seeded constructs on tendon repair biomechanics and histology / Juncosa-Melvin N., Boivin G.P., Galloway M.T. et al. // Tissue Eng. – 2005. – Vol.11. – P.448-457.
7. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite / Awad H.A., Boivin G.P., Dressler M.R et al. // J. Orthop. Res. – 2003. – Vol. 21 – P. 420-431.

Надійшла 12.11.2012 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін