

Застосування мезенхімальних стромальних клітин для відновлення хрящової тканини

UDC 611.013.395:611.728

N.O. VOLKOVA^{1*}, O.I. GONCHARUK¹, I.A. ZASADNYUK², M.S. FILIPPOVA¹, V.I. GRYSCHENKO¹

Use of Mesenchymal Stromal Cells for Recovery of Cartilage Tissue

В роботі дана оцінка можливості застосування мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку для відновлення хрящової тканини. Розглянуті дві моделі ушкодження хряща з різною локалізацією, а саме дефект суглобового хряща та дегенеративне ураження міжхребцевих дисків. Показано, що застосування клітинної терапії в експерименті призводить до відновлення пошкодженої тканини.

Ключові слова: хрящова тканина, мезенхімальні стромальні клітини, відновлення, гістологічні дослідження.

В работе дана оценка возможности применения мезенхимальных стромальных клеток костного мозга для восстановления хрящевой ткани. Рассмотрены две модели повреждения хряща с разной локализацией, а именно дефект суставного хряща и дегенеративное повреждение межпозвоночных дисков. Показано, что применение клеточной терапии в эксперименте приводит к восстановлению поврежденной ткани.

Ключевые слова: хрящевая ткань, мезенхимальные стромальные клетки, восстановление, гистологические исследования.

In this work possible marrow mesenchymal stromal cell application was estimated for cartilage tissue renewal. Two models of cartilage injury with different localization were considered, they were namely the defect of articular cartilage and degenerative intervertebral damage. It was shown that cell therapy application in an experiment led to damaged tissue renewal.

Key-words: cartilage tissue, mesenchymal stromal cells, renewal, histological study.

У сучасній ортопедії та травматології тактика лікування хворих з пошкодженням хряща характеризується складністю, багатоетапністю та низькою ефективністю, що пояснюється функціональною недостатністю хондроцитів, їх неспроможністю підтримувати на достатньому рівні метаболічні та репаративні процеси у хрящовій тканині [1, 4–6]. Одним із перспективних шляхів залучення до медичної практики досягнень клітинної біології є застосування стовбурових клітин з метою відновлення та запуску регенераційно-репаративних процесів в організмі [10, 12]. Основним джерелом стовбурових клітин у дорослому організмі є мезенхімальні стромальні клітини (МСК) кісткового мозку – попередники всіх клітин сполучної тканини. Ці клітини мають здатність до диференціювання у клітини сполучної тканини, включаючи кістку, жир, хрящ і мускулатуру [3, 7]. На сьогодні багато вже вивчено про виділення МСК, їх характеристику та здатність до диференціювання [8, 9, 11]. В дорослому організмі ці клітини є резервуаром стовбурових клітин, які мобілізуються при ушкодженні і мігрують у рану, де в кооперації із соматичними клітинами беруть участь в репаративному процесі [2]. Вважається, що МСК є пластичним матеріа-

лом для тканинної інженерії хрящової тканини, які можуть бути отримати із спонгіозної кісткової тканини [10, 12].

Мета роботи – оцінити потенційні можливості стовбурових мезенхімальних клітин в регенерації хрящової тканини у експериментальних тварин з травматичним дефектом суглобового хряща та дегенеративним ураженням міжхребцевих дисків.

Матеріали та методи

Кістковий мозок отримували із резекційованих стегнових кісток шляхом механічної дезагрегації. Для виділення моноклеарної фракції використовували високу адгезивну здатність МСК до пластика. Культивування вели по відпрацьованій методиці, яка забезпечує максимальне очищення культури від клітин гемопоетичного ряду протягом 14 діб. Перша серія експериментів була виконана на 30 дорослих кролях-самцях масою $3,0 \pm 0,25$ кг. У всіх тварин під кетаміновим наркозом парapatеллярно розтинали суглобову капсулу колінного суглоба та скальпелем наносили з використанням шаблону стандартне повношарове пошкодження суглобового хряща розміром 6 на 3 мм без пошкодження цілісності підхрящової кісткової плас-

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Інститут травматології і ортопедії АМН України, м. Київ

* Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute of Traumatology and Orthopedics of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

тинки. Після цього поширено зашивали м'які тканини. Тваринам контрольної групи на 5 день після зашивання суглобової рани в порожнину оперованого колінного суглоба вводили по 0,25 мл сольового фізіологічного розчину. Тваринам дослідної групи на 5 день в порожнину оперованого колінного суглоба вводили по 10^6 аутологічних МСК.

Друга серія експериментів була виконана на 50 дорослих щурах-самцях масою 300–350 г. У всіх тварин під кетаміновим наркозом проводили резекцію 2/5 довжини хвостового відділу хребта на рівні S_{XX-XI} , а отриману культуру підшивали під шкіру спини на 1 см краніально люмбально-сакрального з'єднання. Вздовж хвоста додатково формували анастомоз між шкірою хвоста та спини довжиною 1,5 см. Таким чином формували компресію міжхребцевих дисків на рівні S_{V-VI} , S_{VI-VII} , $S_{VII-VIII}$. Оцінку ефективності моделювання патології міжхребцевих дисків проводили за допомогою спіральної комп'ютерної томографії (КТ). Тваринам контрольної групи через 6 тижнів після створення компресії у зону ураження вводили по 0,25 мл сольового фізіологічного розчину. Тваринам дослідної групи через 6 тижнів у зону ураження вводили по 10^6 МСК.

За всіма тваринами проводили клінічне спостереження. Із дослідів тварин виводили шляхом застосування летальних доз ефіру для наркозу в строки 21 та 45 діб після початку експерименту. Оцінку якості репаративних процесів в місцях дефекту проводили за допомогою гістологічних методів. При цьому оцінювали поверхневу будову регенерату, морфологію новоутвореної тканини, структуру її матриксу, характер і життєздатність хондроцитів, стан кальцифікованої зони хряща. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до "Загальних принципів експериментів на тваринах, схвалених II Національним конгресом з біоетики" (2004 р., м. Київ).

Результати та обговорення

Візуальні дослідження колінних суглобів тварин з лікуванням та без виявили суттєву різницю між групами. У тварин контрольної групи при розтині колінного суглоба відмічалось збільшення кількості синовіальної рідини. Зона дефекту мала гіпертрофовані краї та була частково заповнена тканиною жовтого кольору. У тварин з терапією патологічних змін з боку капсули та синовіальної рідини не виявлено. Гістологічні дослідження показали, що в контрольній групі мікроскопічно дефект суглобового хряща заповнений грануляційною сполучною тканиною. Матрикс регенерату дезорганізований особливо в поверхневій та середній зонах, що проявляється в його розшаруванні. Клітинний склад регенерату представлено переважно веретеноподібними клі-

тинами, в яких спостерігаються ознаки дистрофії та некрозу. При мікроскопічному дослідженні суглобового хряща тварин з введенням МСК спостеріглося повне заповнення зони дефекту гіаліноподібною хрящовою тканиною з рівною, однорідною поверхнею. Колагенові волокна матриксу регенерату нерівномірної щільності та не мають певної орієнтації. Регенерат представлено клітинами, які морфологічно наближаються до клітин гіалінового хряща.

Візуально та за даними КТ не було відмічено різниці у висоті дисків тварин дослідної групи та інтактних тварин. Мікроскопічні дослідження гістологічних препаратів зони ушкодження міжхребцевих дисків тварин з терапією МСК показали, що на 21 добу дефект був заповнений хрящовим регенератом без ознак його патологічного розростання та некрозу. Новоутворена хрящова тканина поширювалась у дефекти та тріщини і щільно з'єднувалась з неушкодженими колагеновими волокнами фіброзного кільця.

Висновки

Наведені дані свідчать, що застосування культури МСК кісткового мозку при введенні в зони повношарового дефекту колінного суглобу та дегенеративного ураження міжхребцевих дисків позитивно впливає на репараційно-відновлювальні процеси в хрящовій тканині.

Література

1. Павлова В.Н., Копьева Т.Н., Слуцкий Л.И., Павлов Г.Г. Хрящ. – М.: Медицина, 1988. – 317 с.
2. Соколова И.Б., Зинькова Н.Н., Шведова Е.В. и др. Распределение мезенхимальных стволовых клеток в области тканевого воспаления при разных способах трансплантации клеточного материала // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – №1. – С.34–37.
3. Суздальцев Ю.Г., Бурунова В.В., Вахрушев И.В. и др. Сравнение способности к дифференцировке в ткани мезодермального происхождения мезенхимальных клеток человека, выделенных из разных источников // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – №1. – С. 3–10.
4. Ahn J.I., Terry Canale S., Butler S.D., Hasty K.A. Stem cell repair of physeal cartilage // J. Orthop Res.– 2004.– Vol. 22, N6.– P. 1215–1221.
5. Chost P., Smith M. Osteoarthritis, genetic and molecular mechanisms // Biogerontology.– 2002.– Vol. 3.– P. 85–88.
6. Gigante A., Chillemi C., Bevilacqua C. Articular cartilage: histological and biochemical aspects // Basic science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: current status and prospects / Ed. S. Zanasi, M. Brittberg, M. Marcacci.– 2006.– Vol. 1.– P. 53–58.
7. Lee C.R., Grodzinsky A.J., Hsu H.P., Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model // J. Orthop Res.– 2003.– Vol. 21, N2.– P. 272–281.
8. Nummerger S., Marlovits S. Electron microscopy of human articular chondrocytes // Basic science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: current status

- and prospects / Ed. S. Zanasi, M. Brittberg, M. Marcacci.– 2006.– Vol. 1.– P. 59–68.
9. *Ponticello M.S., Schinagl R.M., Kadiyala S. et al.* Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy // *J. Biomed Mater Res.*– 2000.– Vol. 52, N2.– P. 246–255.
 10. *Wakitani S., Mitsuoka T., Nakamura N. et al.* Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports // *Cell Transplant.*– 2004.– Vol. 13, N5.– P. 595–600.
 11. *Roberts S., Evans H.* Microscopic assessment of cartilage and cartilage repair // *Basic science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: current status and prospects* / Ed. S. Zanasi, M. Brittberg, M. Marcacci.– 2006.– Vol. 1.– P. 123–131.
 12. *Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T. et al.* Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees // *Osteoarthritis Cartilage.*– 2002.– Vol. 10, N3.– P. 199–206.

Надійшла 08.07.2008