

УДК 616.718.4–001.5:599.23+ 616.71–018.46–089.843

© Колектив авторів, 2013

ВИВЧЕННЯ ОСТЕОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ В ДЕФЕКТ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

В. М. Шимон, А. А. Шерегій, М. В. Шимон, О. М. Вайнагій, В. В. Литвак

Кафедра загальної хірургії з курсами травматології та ортопедії, оперативної хірургії та судової медицини (зав. – д. мед. н., проф. Шимон В. М.), медичний факультет, Ужгородський національний університет. 88000 Україна, м. Ужгород, вул. Підгірна, 46. E-mail: kaftravm@rambler.ru

THE STUDY FOR OSTEOGENIC AKTIVITY OF THE TRANSPLANTATED BONE MARROW CELLS INTO THE DIFFERENT OF AGE EXPERIMENTAL RATS HIP BONE DEFECT

V. M. Shimon, A.A Shereghy, M. V. Shimon, O. M. Vajnagij, V. V. Litvak

SUMMARY

In our research on 60 rats we had studied osteogenic activity of the bone marrow stem cells after transplantation into the different of age experimental rats hip bone defect. There were more new colonies in the bone defect in the group of the young rats, as in the senior rat's group. The stromal cells osteogenic activity factors were higher in 13,7 times in the group of the young rats, than in the senior rat's group.

ИЗУЧЕНИЕ ОСТЕОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В ДЕФЕКТ БЕДРЕННОЙ КОСТИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

В. М. Шимон, А. А. Шерегій, М. В. Шимон, О. М. Вайнагій, В. В. Литвак

РЕЗЮМЕ

В результате эксперимента проведенного на 60 крысах 2-х возрастных групп установлено, что у культурах клеток молодых крыс количество новообразованных колоний было достоверно больше, чем показатели культур старых крыс, а остеогенная активность стромальных клеток костного мозга молодых крыс превосходила аналогичные показатели стромальных клеток костного мозга старых крыс в 13,7 раза.

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

Вивчення реактивності і регенерації кісткової тканини та розробка питань направлено впливу на процеси загоєння кісткової рани залишаються актуальними проблемами сучасної медицини. Особливо гостро стоїть питання репаративної регенерації кісткової тканини зв таких галузях, як ортопедія та травматологія.

Репаративна регенерація являє собою процес відновлення клітин, тканин або органа після травми, різних патологічних процесів. С. С. Ткаченко під репаративною регенерацією розуміє складний процес, який викликаний руйнуванням кісткових структур, кількісно перевершуючим допустимі межі фізіологічної регенерації, та направлений на відновлення анатомічної цілісності і забезпечує функції кістки [7]. При наявності та на фоні постійної розробки та вдосконалення різноманітних конструкцій для з'єднання кісткових відламків можливості впливу на загоєння кісткової рани залишаються обмеженими [5, 6, 7, 8].

Ряд експериментів на тваринах указує на те, що навіть при умові точного співставлення кісткових уламків та утримання їх в необхідному положенні відмічається різноманіття морфологічних варіантів регенерату та термінів заживлення пошкодженої кістки, що може бути пов'язаним з високою чутливістю кісткової тканини до змін умов її існування [4]. Експериментальні дослідження по даній проблемі

ведуться в різних напрямках. Одним із таких напрямків є розробка біологічно активних речовин (факторів росту), які являються стимуляторами стимуляторами остеогенезу, серед яких основна роль в цих процесах належить кістковим морфогенетичим білкам [6]. На сьогоднішній день активно розвивається новий напрям регенераторної медицини – клітинна та тканинна інженерія [7, 8]. Клітинні технології включають в 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 [8]. Дослідники пов'язують можливість застосування стромальних клітин кісткового мозку при їхній трансплантації на біосумісних носіях. [2, 3, 9, 10]. Клітини на матрицях використовують для відновлення проблемних пошкоджень кістки – багато-уламкові 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 остеогенеза, встановлено, що існує багато факторів ризику, здатних порушити протікання цього процесу. Серед них – стан кісткової тканини мешканців «проблем-

них» районів з дефіцитом йоду, збільшеним вмістом фтору, радіаційним фоном тощо. Доведена низька регенераторна активність у пацієнтів з цукровим діабетом, при нейрофіброматозі та інших захворювань. У зв'язку з цим, дослідники звертають увагу на біологічні стимулятори остеогенезу, а саме, на застосуванні культивованих остеопрогеніторних клітин.

Мета дослідження. Провести порівняльний аналіз остеогенної активності клітин кісткового мозку щурів різного віку.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Кістковий мозок отримували із велико гомілкової та стегнової кісток інтактних щурів 3-місячного та 18-місячного віку. Суспензію клітин центрифугували (1000 об/хв протягом 5 хвилин), промивали розчином Хенкса, ресуспендували у культуральному середовищі. Для відокремлення агрегатів клітин суспензію фільтрували крізь нейлоновий фільтр у мірну пробірку і вимірювали об'єм суспензії. Визначали загальну кількість вилучених клітин та число мертвих – при застосуванні трипанового синього. Клітини висівали у пластикові культуральні флакони у кількості $1,0 \times 10^6$ клітин на 1 cm^2 площі флакона і культивували у модифікованому живильному середовищі Ігла (ДМЕМ із L-глутаміном, 10% телячої сироватки, 100 IU/мол пеніциліну, 100 мкг/мол стрептоміцину) у CO_2 інкубаторі при температурі 37°C у середовищі з 5% CO_2 і 95% вологості. Для одержання культур адгезивних клітин через 2 години після експлантації середовище з клітинами, що не прикріпилися, зливали. Клітини на дні культурального флакона промивали розчином Хенкса і додавали свіже живильне середовище, яке змінювали двічі на тиждень. Утворення клітинних колоній досліджували на 14 добу культивування після фіксації клітин та фарбування за Романовським. Остеогенну активність стромальних клітин кісткового мозку (СККМ) визначали за кількістю сформованих колоній та показником ефективності клонування клітин (за методикою Астахової В. С.). Культивовані стромальні клітини щурів різного віку були трансплантовані у змодельовані дефекти дистального відділу стегнової кістки щурів аналогічного віку. Результати регенерації кісткових дефектів досліджували на 14 добу при використанні морфологічних методів.

Використовували цитологічні та гістологічні методи. Для контролю одне із скелець культивованих клітин було забарвлено азур-еозином. Фрагменти стегнової кістки щурів з травматичним пошкодженням були підготовані для дослідження за стандартною методикою. Зрізи забарвлювали гематоксиліном 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].

В експерименті було використано 60 щурів розподілених на 2 вікові групи, молоді та старі відповідно. Утримання і догляд за тваринами та всі маніпуляції проводилась у відповідності з правилами гуманного відношення до тварин та положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним Конгресом з біоетики (Київ 2001). А також «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Стасбург 1986)

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При цитологічному дослідженні культивованих клітин було встановлено, що у культурах клітин щурів обох вікових груп спостерігалось утворення клітинних колоній. Проте, якщо у культурах клітин кісткового мозку молодих щурів переважними були крупні проліферативно активні компактні колонії стромальних клітин, то у культурах старих тварин – переважали невеликі за розмірами дифузні клітинні колонії, які мали у своєму складі клітини з вираженою дегенерацією. Клітинні колонії молодих та старих щурів відрізнялися не тільки якісно, але і кількісно. У культурах клітин молодих щурів кількість колоній була вірогідно вищою за показники культур старих щурів, а остеогенна активність СККМ молодих щурів перевищувала аналогічні показники СККМ старих щурів у 13,7 раза.

Структура регенерату у кісткових дефектах із трансплантованими клітинами старих щурів на 14 добу не відрізнялася від регенерату, сформованого у кісткових дефектах контрольних щурів – без трансплантації клітин. Регенерат був представлений фіброретикулярною тканиною. У разі трансплантації культивованих клітин молодих щурів – у регенераті переважала кісткова тканина (переважно пластинчаста), в той час як у регенераті контрольних щурів – спостерігалась фіброретикулярна та грубоволокниста кісткова тканини. Лише місцями виявлялися осередки пластинчастої кісткової тканини.

ВИСНОВКИ

Трансплантація культивованих стромальних клітин кісткового мозку в кістковий дефект стимулює репаративний остеогенез у молодих щурів.

Остеогенний потенціал СККМ старих щурів – низький і при трансплантації культивованих клітин у кістковий дефект не відбувається оптимізації остеорепації, на відміну від СККМ молодих щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, – 1990. – 381 с.
2. Волков А. В. Тканевая инженерия: новые перспективы развития медицины / А. В. Волков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 1. – С. 57–63.

3. Дедух Н. В. Регенерація кістки: досягнення та перспективи / Н. В. Дедух, С. В. Малишкіна // Травма. – 2006. – Т. 7, – № 2. – С. 212–216.
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. 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.
6. Ткаченко С. С. Статические электрические потенциалы кости и роль вектора поляризации при электростимуляции остеорепарации // Ортопедия, травматология и протезирование. – 1981. – № 10. – С. 1–5.
7. Шимон В. М. Трансплантація культивованих клітин кісткового мозку в модельований дефект (експериментальне дослідження) / Шимон В. М., Шерегий А. А. // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 14. (2) – 2010 р.с. – 261–265.
8. 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.
9. 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. – 2006. – Vol. 32. – № 30. – P. 341–348.
10. Wagner W. / How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? // W. Wagner, S. Bork et al. // Aging. – 2010 – Vol. 2/ – № 4. – p. 224–230,.