

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ОСТЕОГЕННЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РЕПАРАТИВНЫЙ ОСТЕОГИСТОГЕНЕЗ В ОБЛАСТИ ДЕФЕКТА ТЕМЕННЫХ КОСТЕЙ

© Р. В. Деев,¹ Н. В. Цупкина,² В. Г. Гололобов,¹ Н. С. Николаенко,² Д. Е. Иванов,¹
А. К. Дулаев,¹ Г. П. Пинаев²

¹ Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: romdey@inbox.ru

В последнее время очень активно изучается проблема, связанная с трансплантацией культуры стромальных (остеогенных) клеток костного мозга с целью оптимизации репаративного остеогенеза. Однако как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях недостаточно используются объективные методы, позволяющие наблюдать поведение пересаженных клеток в костной ране и оценивать характер восстановительного костеобразования после пересадки клеток. Цель нашего исследования — проследить судьбу пересаженных клеток в костной ране и изучить влияние культуры костномозговых стромальных (остеогенных) клеток на посттравматический остеогистогенез при их трансплантации в область дефекта теменных костей. Исследование выполнено на 38 кроликах, у которых искусственно формировали дефект теменной кости диаметром 1 см. Животные были разделены на три группы: первая служила контролем; второй группе инъекционно в область дефекта теменной кости вводили взвесь аутогенных культивированных костномозговых стромальных (остеогенных) клеток (в количестве 10^6); третьей группе ddjlbkb rekmbdbbhjdfyust fenjutyust jentjutyust rkturb tjspujuj vjpuj (в количестве 10^6), равномерно распределенные в коллагеновом геле объемом 1 см^3 . Для оценки результатов были использованы методы световой и флуоресцентной микроскопии, гистоморфометрии и статистической обработки данных. Установлено, что пересаженные клетки сохраняют свою жизнеспособность по крайней мере в течение 18 сут и продуктивно участвуют в репаративном процессе. Пересадка культивированных костномозговых стромальных (остеогенных) клеток костного мозга в коллагеновом геле вызывает увеличение доли костной ткани до 30 % в составе регенерата по сравнению с контролем на 120-е сут.

Ключевые слова: стромальные (остеогенные) клетки, культура клеток, репаративный остеогенез, костный дефект, трансплантация клеток.

Разработка методов трансплантации предшественников костных клеток с целью оптимизации течения репаративных процессов при переломах и их осложнениях является актуальной для теоретической морфологии и практической медицины. Врачи уже получили положительные результаты клеточных трансплантаций, которые свидетельствуют о доступности подобных методик и их эффективности для лечения дефектов костей — отсутствия костной ткани на протяжении 1 см и более (Гололобов, 1997; Шаповалов и др., 1999; Schaefer et al., 2000; Mankani et al., 2001; Veda et al., 2001; Lendeckel et al., 2004).

Весьма перспективен данный метод для пластики костей черепа, характеризующихся низким регенераторным потенциалом (Матвеева, 1962). Клиницистов привлекает возможность закрывать большие дефекты костей, используя изначально малое количество костного мозга. Экспериментальной моделью при таких исследованиях служили различные по диаметру дефекты костей свода черепа. В зону дефекта вводили взвесь культивированных клеток (Саргсян, 1990). Следует отметить, что лучшие результаты были получены при трансплантации клеток в сочетании с порошком альгината кальция (Shang et al., 2001) или на формообразующем носителе, например деминерализо-

ванном костном матриксе (Gurevitch et al., 2003; Кругляков и др., 2005). Однако в упомянутых работах отсутствовали гистологический и гистоморфометрический анализ процесса репаративного остеогистогенеза, а также описание динамики этого процесса. Остается непонятным, за счет каких клеток происходит описываемое улучшение остеогенеза — привнесенных в костную рану при трансплантации или клеток реципиентного ложа, получивших пролиферативную и дифференцировочную индукцию. Пока не выяснено, сохраняют ли пересаженные клетки свою жизнеспособность в ране. В момент повреждения и на стадии экссудации на них воздействуют множество провоспалительных цитокинов, протеаз, неоднородно влияющих на пролиферативную и миграционную активность клеток (Воронкина, 2003). Несмотря на это, часть способов применения стромальных (остеогенных) клеток уже входит в медицинскую практику (Зорин и др., 2004).

Цель исследования — проследить судьбу пересаженных клеток в костной ране и изучить влияние культуры костномозговых стромальных (остеогенных) клеток на посттравматический остеогистогенез при их трансплантации в область дефекта теменных костей.

Материал и методика

Исследование выполнено на 38 кроликах породы шиншилла обоего пола. Все манипуляции с кроликами осуществляли с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Report of the AVMA panel on euthanasia, 2001).

Культуру клеток получали по известным протоколам (Деев и др., 2004; Николаенко и др., 2004). Клетки высевали в одноразовые пластиковые чашки Петри из расчета $5 \cdot 10^5$ — $7 \cdot 10^5$ кл./см². Среда имела следующий состав: DMEM и F12 (ISN, США) в соотношении 3 : 1 с добавлением 20 % сыворотки плодов коров (Биолот, РФ; ISN, США) и гентамицина (50 мкг/мл). Смену среды производили каждые 3 сут. После первой смены в нее добавляли аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл). Первый пересев осуществляли по достижении монослоя первичной культуры. После первого пассажа с целью индукции направленной остеогенной дифференцировки в среду добавляли L-аскорбат (0.2 мМ), β -Na-глицерофосфат (10 мМ) и дексаметазон (10^{-8} моль/л). Поэтому полученные в результате культивирования клетки могут считаться остеогенными.

Всем животным-реципиентам при помощи корончатой фрезы под местным обезболиванием раствором новокаина (0.25 или 0.5 %) латеральное сагиттальное шва формировали отверстие диаметром 1 см так, чтобы не повреждать твердую мозговую оболочку. У животных I группы (контроль) дефекты заживали без дополнительных лечебных манипуляций. Животным II группы инъекционно в область дефекта через 3—4 сут после формирования дефекта вводили взвесь аутогенных культивированных остеогенных клеток в количестве 10^6 . Кроликам III группы вводили культивированные аутогенные остеогенные клетки костного мозга (в количестве 10^6), равномерно распределенные в коллагеновом геле объемом 1 см³. (Коллагеновый гель был любезно предоставлен д-ром Л. В. Кухаревой, Институт цитологии РАН).

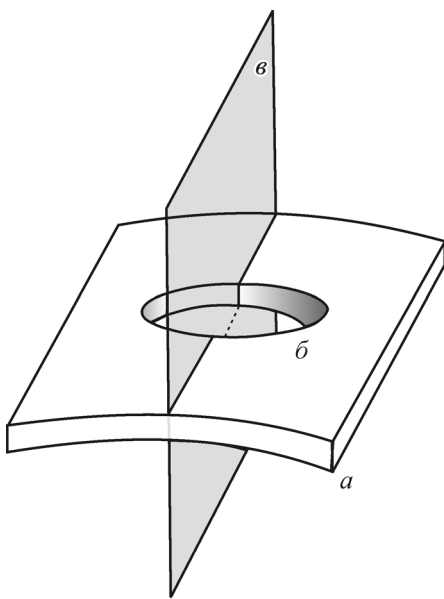


Рис. 1. Схема прохождения плоскости среза при изготовлении гистологических препаратов.

a — теменная кость, *b* — дефект кости, *v* — плоскость среза.

Материал, включающий в себя зону дефекта в теменной кости, прилежащие твердую мозговую оболочку и апоневротический шлем, получали на сроках 3, 7, 15, 30, 60, 90 или 120 сут (рис. 1). Изготавливали гистологические препараты по стандартной методике. Срезы окрашивали гематоксилином по Майеру и эозином, а также трехкомпонентными красителями для селективного выявления различных видов соединительной ткани — по Маллори, по Румянцеву (Саркисов, 1996). Из полученных препаратов составляли гистопограммы, фотографировали цифровой камерой и при помощи компьютера выполняли удаление всех «мягких тканей», так чтобы изображение содержало только минерализованную костную ткань. Полученные изображения подвергали качественному и количественному анализу.

Для оценки выживаемости трансплантированных клеток использовали прижизненный краситель РКН-26 (Sigma, США). После получения взвеси культивированных клеток обрабатывали раствором красителя в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Часть клеток обязательно переносили в культуральную посуду для контроля за жизнеспособностью после мечения и исключения контаминации в ходе манипуляций с культурой. Основную часть меченых клеток помещали в коллагеновый гель и вводили экспериментальным животным в дефект костей черепа. Фрагменты регенерата забирали после выведения животных из эксперимента на сроках 4, 12 или 18 сут, в течение которого краситель сохранялся в клетках. Ткани фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида, срезы готовили на замораживающем микротоме и заключали под покровные стекла в пропилгалат. Препараты изучали в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 5 PASCAL на базе инвертированного микроскопа AXIOVERT 200M (Carl Zeiss, Германия) при различных режимах.

Помимо качественного описания восстановительного процесса регенерации (цитологического и гистологического анализа) осуществляли подсчет доли костной ткани (ДКТ) в регенерате. Для обеспечения достоверности результатов дефект от края до центра разделили на четыре зоны: краевые (А и Б) и центральные (В и Г), в каждой из которых оценивали площадь, занимаемую костной тканью, по отношению ко всей площади дефекта (%).

При статистической обработке полученных данных описывали изучаемые параметры в группах, оценивали значимости различий количественных показателей в группах и влияние качественных факторов на количественный параметр-отклик. С помощью статистического анализа определяли числовые характеристики переменных; оценивали соответствие эмпирического закона распределения количественных переменных теоретическому закону нормального распределения по критерию Колмогорова—Смирнова и значимость различий количественных показателей в независимых выборках с использованием LSD-теста; проводили многофакторный дисперсионный анализ. В результате вычисляли средние значения, стандартные отклонения, ошибки средней арифметической, а также вычисляли суммы квадратов отклонений параметра-отклика, средние квадраты отклонений или дисперсии; степень влияния (K_j , %) контролируемых (время от момента трансплантации, фактор трансплантации и сочетание этих факторов) и неконтролируемых факторов на параметр-отклик — ДКТ в составе регенерата (Юнкеров и др., 2002). Статистическую значимость различий оценивали по *F*-критерию Фишера при $P < 0.05$. Использовали

пакеты прикладных программ: Statistica for Windows 6.0 (ANOVA/MANOVA) — для статистического анализа, MS Office 2003 — для организации и формирования матрицы данных, подготовки графиков.

Результаты и обсуждение

Посттравматический гистогенез в зоне дефекта теменной кости (I группа). Первичные реактивные изменения в костной ране, регистрируемые через 3 сут после повреждения, типичны для костной ткани (Гололобов, 1997). Костная ткань краев дефекта содержала пустые остеоцитарные лакуны, что свидетельствовало о гибели ее участков. Следует отметить, что уже к этому сроку в гематому врастали клетки фибробластического ряда и кровеносные сосуды, что свидетельствовало о формировании временного мультитканевого образования — «грануляционной ткани». Через 3—7 сут на наружном и внутреннем кортикальных слоях вблизи края дефекта, а также на поврежденных трабекулах обнаруживали остеокласты. Отчетливые реактивные изменения наблюдали со стороны периоста краев костного дефекта. Отмечали гиперплазию остеогенного слоя, причем уже через 3 сут после травмы практически невозможно было дифференцировать в периосте глубокий и волокнистый слой. Помимо проявления пролиферативной активности клетки, прилегающие к кости, синтезировали межклеточное вещество — остеоид. Отмечали интенсивную васкуляризацию надкостницы. Признаки репаративного остеогистогенеза отчетливо проявлялись начиная с 7-х сут. К этому сроку в зоне дефекта среди организующейся гематомы при условии интенсивного кровоснабжения регенерата выявляли отдельные остеоидные трабекулы протяженностью до 1 мм. Со стороны костных краев дефекта формировались трабекулы ретикулофиброзной костной ткани, которые начались как от периостальной области, так и от стенок костного дефекта. Для поверхностно расположенных остеонов наружного и внутреннего кортикальных слоев были характерны расширение каналов и заполнение их реактивно измененной рыхлой соединительной тканью. Проллиферативной активности со стороны клеток твердой мозговой оболочки не отмечали.

Своего максимума остеогенез достигал к 15—30-м сут в зонах А и Б. К этому сроку еще больше реализовывались потенции элементов, определяемых как расщепленный камбий костной ткани. Источниками развития костной ткани являлись края дефекта, содержащие остеогенные клетки периоста, эндоста, твердой мозговой оболочки, а также мелких свободнолежащих костных осколков. В центральных зонах дефекта (В и Г) вне связи с исходной костью лежали свободные костные трабекулы ретикулофиброзного строения.

К 30-м сут эксперимента пролиферативные и дифференцировочные процессы в регенерате продолжались. Как и в более ранние сроки, были активированы камбиальные элементы периоста, эндоста, стромы костномозговых полостей. Костные трабекулы заполняли практически весь объем дефекта.

Через 60 сут характер репаративных процессов в зоне повреждения изменился. Вскрытые межтрабекулярные пространства изолировались от дефекта пластинчатой костной тканью, активных очагов остеогистогенеза не обнаруживали. В центральных участках дефекта определялись отдельные тонкие балки костной ткани пластинчатого

строения, причем с височной стороны они были более выражены, что может объясняться лучшим кровоснабжением ветвями височной артерии. Тенденцию к снижению темпов восстановительного остеогенеза отчетливо регистрировали при морфометрии. Через 90 сут зона дефекта практически на всем протяжении была заполнена плотной волокнистой соединительной тканью с высокой степенью упорядоченности коллагеновых волокон. По краю дефекта формировался слой пластинчатой костной ткани по типу замыкательной пластинки, что несколько уменьшало его размер. Вблизи замыкательных пластинок признаков остеогенеза не регистрировали. Спустя 120 сут после нанесения дефекта ремоделирование сформированных костных структур привело к замене участков ретикулофиброзной костной ткани у краев дефекта на пластинчатую. В зоне дефекта регистрировали отдельные свободнолежащие трабекулы без признаков продолжающегося костеобразования.

Остеогистогенез в области дефекта теменной кости после трансплантации культуры остеогенных клеток (II группа). Ранние посттравматические изменения в зоне дефекта теменных костей, определявшиеся на сроке 3—7 сут, существенно не отличались от таковых у животных контрольной серии. Они сводились к формированию кровяного сгустка в ложе дефекта, скрепленного сетью фибрина. К 7-м сут можно констатировать активный неоваскулогенез в «грануляционной ткани».

В это же время наблюдали процессы начинающегося остеогенеза, который проявлялся в формировании минерализующегося ретикулофиброзного костного регенерата. Важно отметить, что регенерат сразу приобретает остеонную организацию, так как формирование костной ткани происходит вокруг близлежащих кровеносных сосудов и отложение минерализующегося межклеточного вещества (будущих костных пластинок) имеет выраженный концентрический характер.

Через 15 сут после повреждения и инъекционно-го введения взвеси культивированных клеток наблюдали активный костеобразовательный процесс, причем он реализовался как в непосредственной близости к краям костного мозга, т. е. в связи с клеточными источниками репаративного остеогистогенеза, так и в центральных участках дефекта без визуальной связи с твердой мозговой оболочкой. Для центральных участков характерно быстрое образование костных трабекул различной формы, построенных из остеоида — неминерализованной костной ткани. В краевой зоне уже через 15 сут среди ремоделирующегося регенерата возможно было обнаружить отдельные остеоны, состоящие из нескольких минерализованных костных пластинок. Свободные трабекулы небольшого диаметра подвергались ранней минерализации.

Морфометрическое исследование показало сохранение общей тенденции к угасанию остеогенеза через 30 сут эксперимента. У животных данной группы этот процесс был менее выражен, чем в контроле. В центральных частях дефекта (В и Г) процесса «транзитного костеобразования» не регистрировали. В этих участках имела тенденция не только к сохранению ДКТ в составе регенерата, но и к последовательному увеличению ее количества — приобретению к 90—120-м сут органотипической архитектоники костных трабекул (рис. 2).

Остеогистогенез в области дефекта теменной кости после трансплантации культуры остеогенных клеток в коллагеновом геле (III

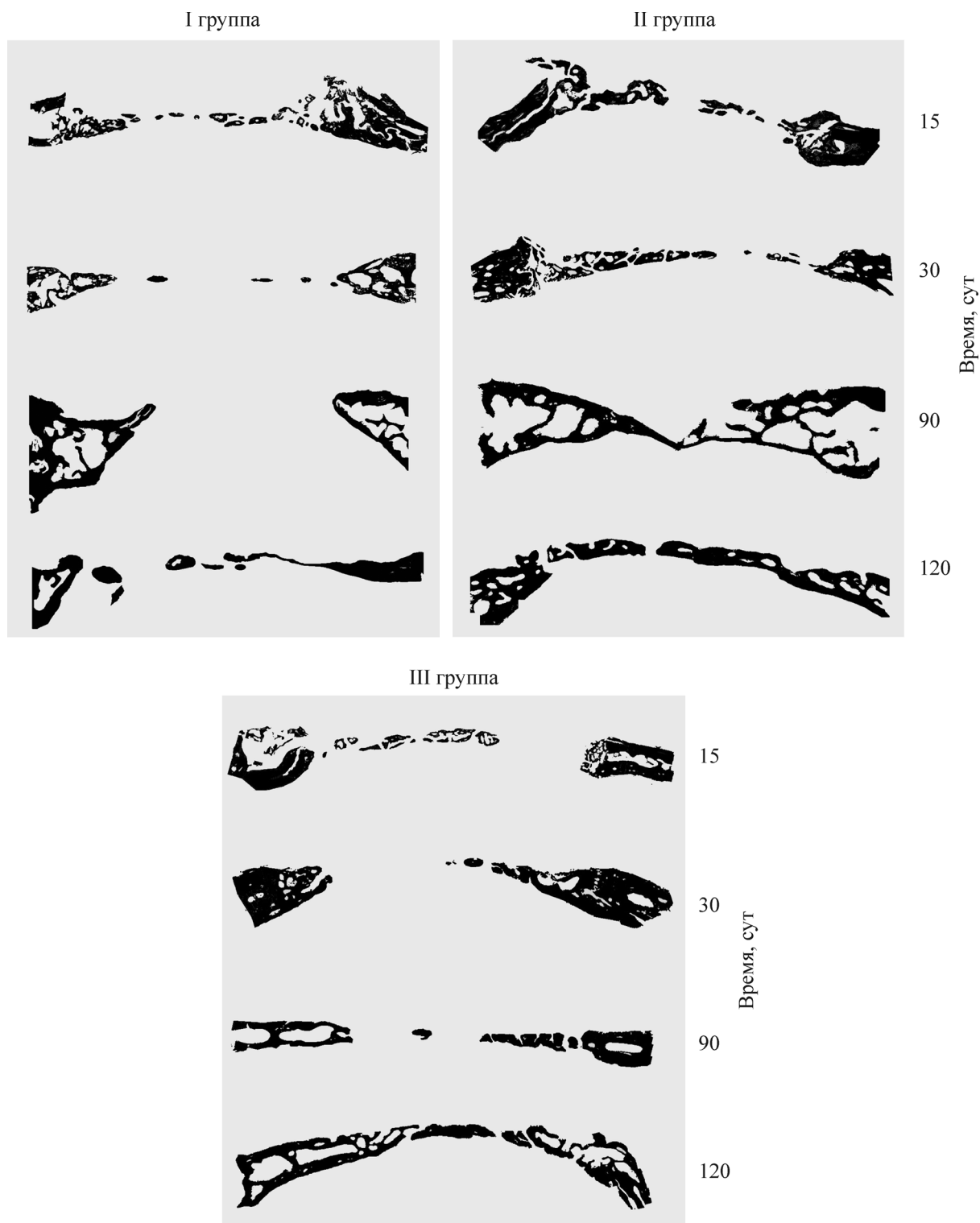


Рис. 2. Деорганифицированные гистотопограммы области дефекта теменной кости на различных сроках у животных трех экспериментальных групп.

I группа — контроль, II группа — введение культуры клеток, III группа — введение культуры клеток в коллагеновом геле.

группа). С целью изучения судьбы пересаженных клеток использовали меченные РКН-26 культивированные клетки. Параллельно трансплантации меченые клетки всегда культивировали как в обычных условиях (рис. 3, а), так и в коллагеновом геле.

В регенерате меченые клетки обнаруживали через 4 сут как в виде одиночных флуоресцирующих образований (рис. 3, б), так и в виде конгломератов (рис. 3, в). Жизнеспособность меченых клеток в костной ране прослеживали до 18-х сут — крайнего срока функциониру-

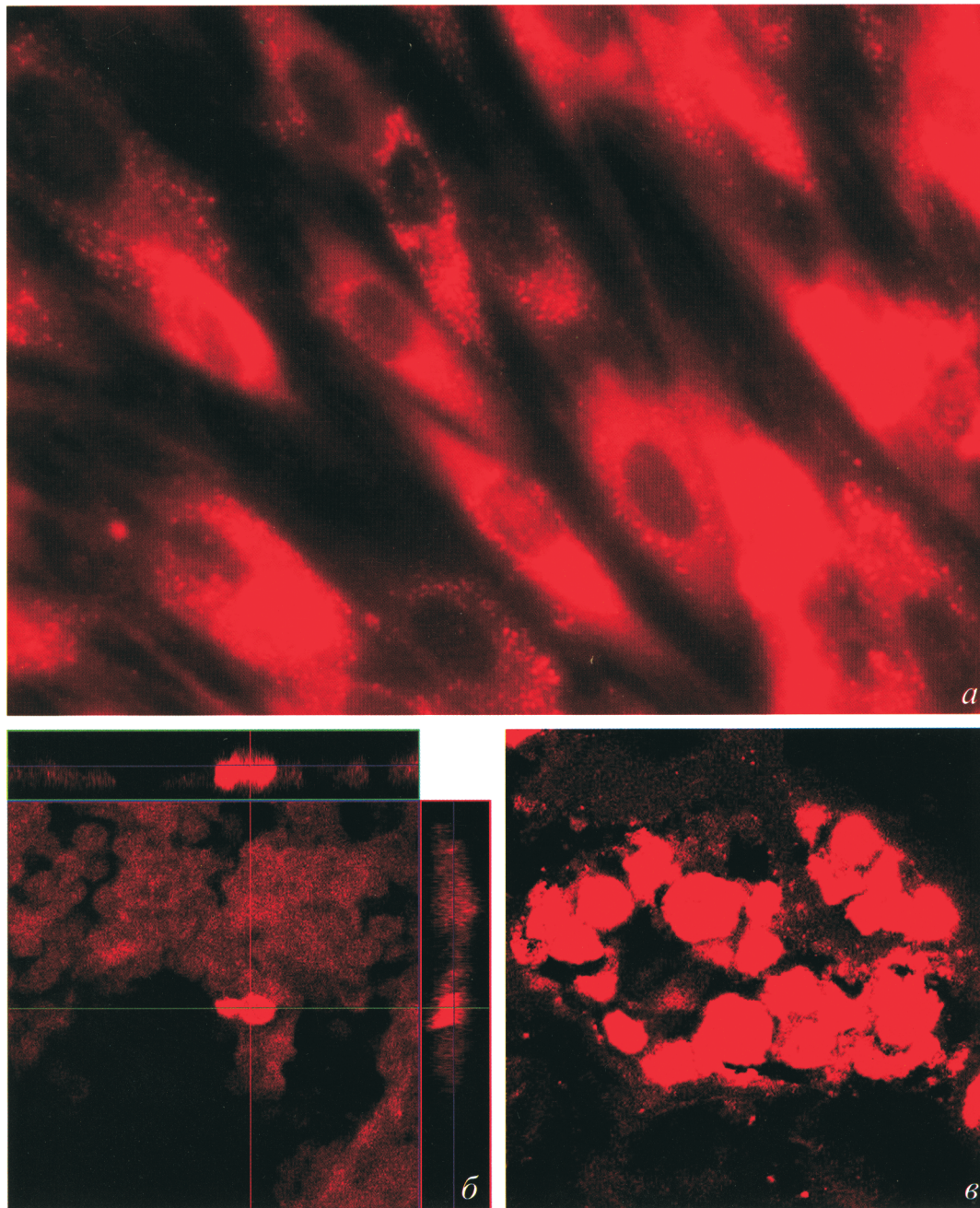


Рис. 3. Остеогенные клетки костного мозга, меченные красителем РКН-26.

a — контроль, монослойная культура; *б, в* — в составе регенерата в костной ране, 4-е сут после трансплантации. Об. 40× (*a*) или 25× (*б, в*).

ния метки. К 12-м сут клетки диффузно распространялись по регенерату соответственно расположению формирующихся коллагеновых волокон (рис. 4, *a*) и могли быть обнаружены вблизи костных трабекул и кровеносных сосудов грануляционной ткани. В некоторых участках клетки группировались и формировали структуры, напоминающие развивающиеся узелки остеохондрогенного строения (рис. 4, *б, в*).

Начальные признаки остеогенеза со стороны краев дефекта наблюдали уже на 3-и сут (у животных II группы — на 7-е сут). Они выражались прежде всего в пролиферативной активности со стороны периоста и эндоста теменных костей. Активно формировался интермедиарный регенерат. Богатая васкуляризация тканей была

одной из причин интенсивного течения раневого остеогенеза. К 7-м сут в области дефекта регенерат был построен в основном из ретикулофиброзной костной ткани. Он составлял около половины площади регенерата в зоне А. Активные остеобласты продуцировали компоненты костного матрикса как со стороны периоста и эндоста, так и со стороны твердой мозговой оболочки. В отличие от данных, полученных на животных I и II групп, вскрытые костномозговые пространства теменных костей не изолировались костными замыкательными пластинками, напротив, именно края дефекта были покрыты активными остеобластами, синтезирующими межклеточное вещество, при этом регенерат рос центростремительно. В массивах костного регенерата вокруг сосудов из минерализиро-

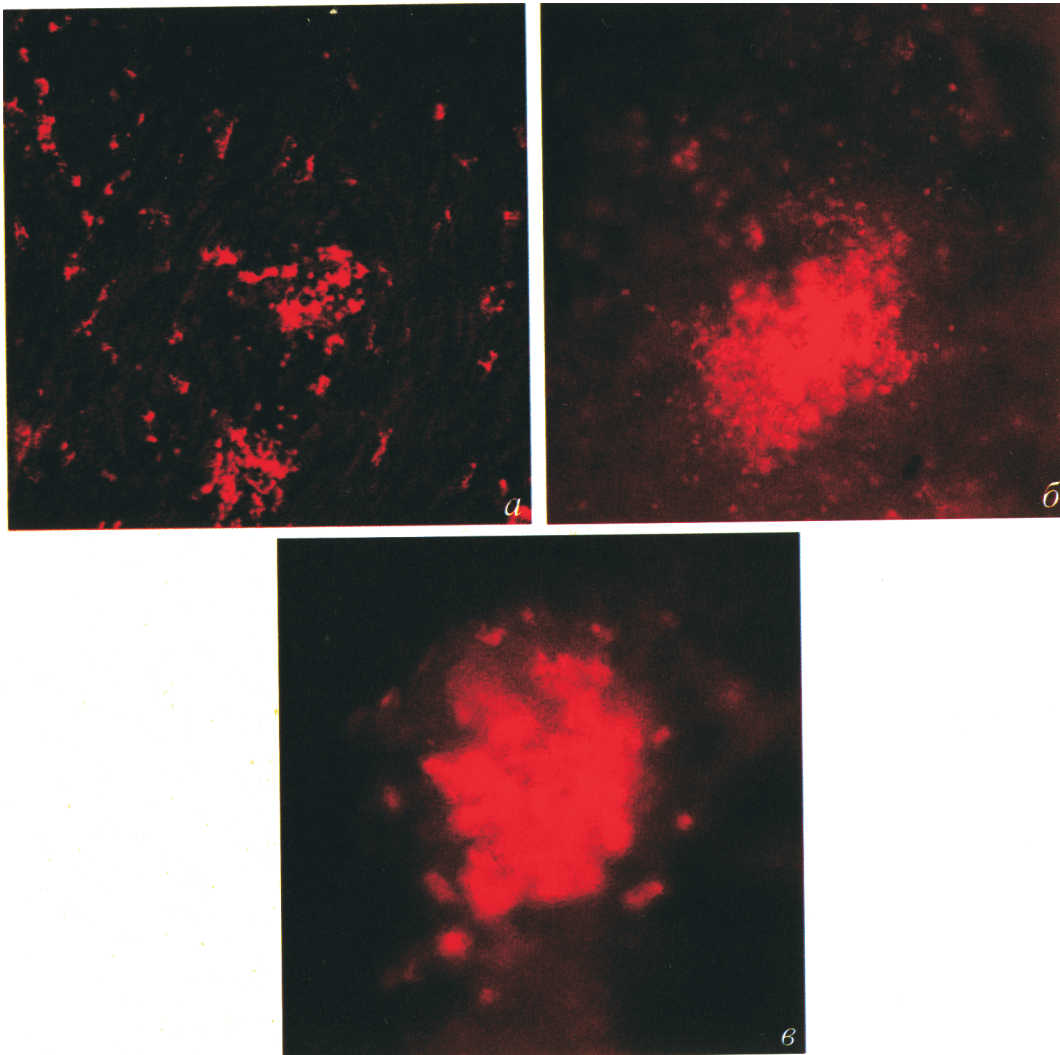


Рис. 4. Остеогенные клетки костного мозга, меченные красителем РКН-26 в составе регенерата.

a — 12-е сут после трансплантации; *б, в* — 18-е сут после трансплантации. Об. $10\times$ (*a*) или $25\times$ (*б, в*). I—III группы экспериментальных животных.

ванных костных пластинок образовывались первичные остеоны.

На 15—30-е сут обнаруживали сформированные трабекулы в центральных отделах дефекта, в дальнейшем (90—120-е сут) они сливались между собой и с краями дефекта, что приводило к увеличению ДКТ в регенерате и закрытию дефекта. Через 30 сут зона дефекта была заполнена костной тканью различной степени зрелости. В краевых участках (зона А) были сформированы новые костно-мозговые полости, в которых заключался костный мозг без признаков реактивных изменений и с высоким содержанием адипоцитов. Центральная часть дефекта заполнена крупными свободными трабекулами, имеющими собственное кровоснабжение. Сосуды врастали в сформированные трабекулы со стороны бывшего периоста. Твердая мозговая оболочка была значительно уплотнена по сравнению с нормой, ее сосудистая сеть расширена.

Дальнейший период характеризовался приростом объема костного регенерата и интенсивной перестройкой ретикулофиброзной костной ткани с формированием типичной пластинчатой костной ткани, а также восстановлением органотипической гистоархитектоники с формированием кости губчатого строения к 120-м сут.

Морфометрическое исследование свидетельствует о продолжающемся увеличении объема костной ткани в регенерате. Особенность остеогенеза при пересадке культуры остеогенных клеток в коллагеновом геле заключалась в том, что, несмотря на некоторое снижение ДКТ через 30 сут, в дальнейшем этот спад не только компенсировался, но и восстанавливалась тенденция к увеличению ДКТ, что приводило через 120 сут после трансплантации к увеличению количества костной ткани на 30 и 40 % по сравнению с животными II группы и с животными в контроле соответственно (рис. 5). Та же закономерность обнаруживается не только в краевой зоне, но и в зонах Б, В и Г. То, что это связано с трансплантацией клеток, показал дисперсионный анализ морфометрических данных. Он позволил установить степень влияния на динамику ДКТ (в %) в составе регенерата двух контролируемых факторов — времени, прошедшего с момента повреждения, и самой трансплантации культуры клеток. Вклад эффектов этих двух факторов и их взаимодействия в дисперсию параметра-отклика (ДКТ в составе регенерата) анализировался в каждом участке регенерата.

Результаты, систематизированные для каждой зоны дефекта, приведены в таблице. Выявлено, что во всех зо-

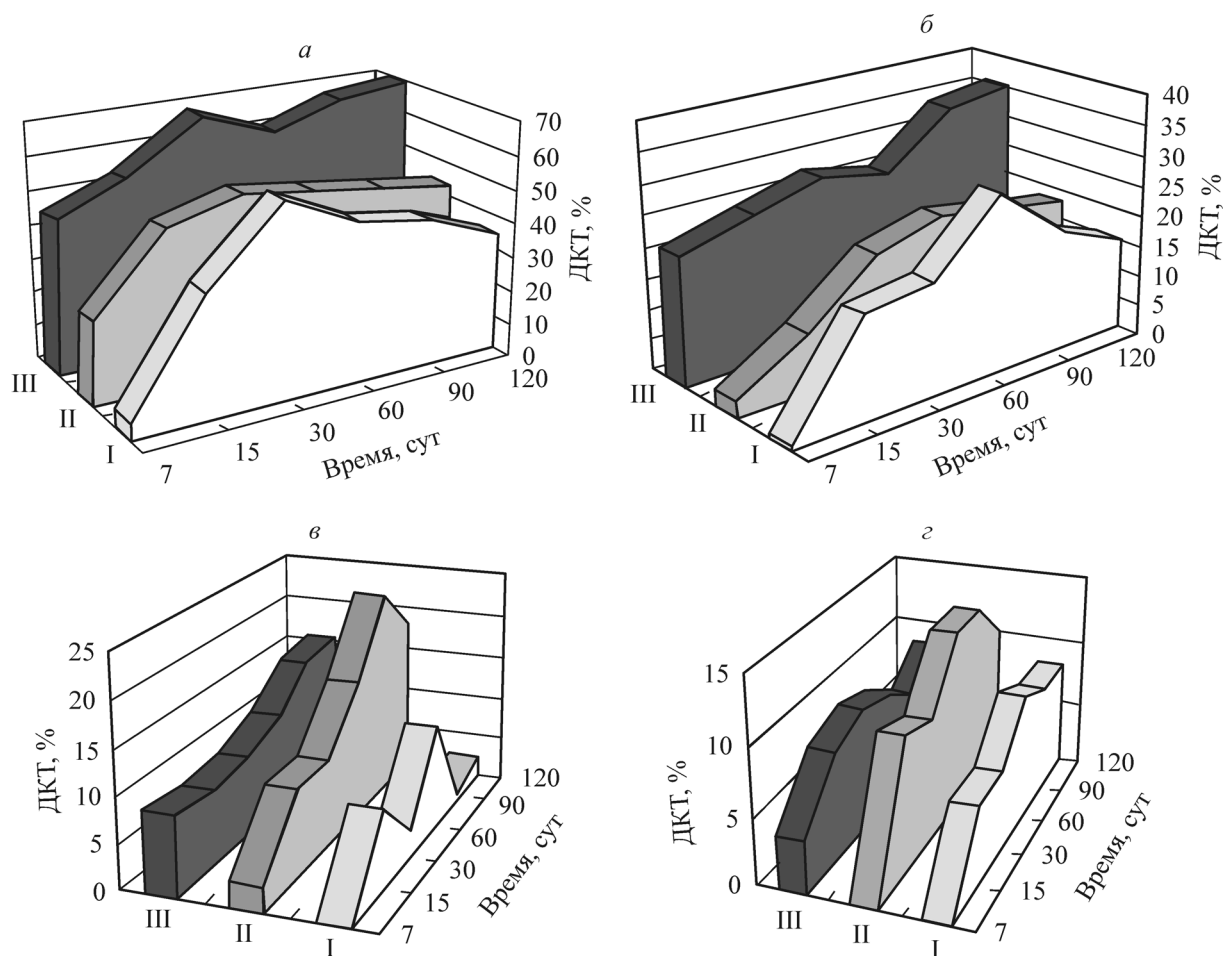


Рис. 5. Доля костной ткани (ДКТ, %) в зонах А (а), Б (б), В (в) и Г (г) дефекта теменных костей на различных сроках после трансплантации.

нах оба фактора (время и трансплантация клеток) оказывали значимое влияние на изменение количества костной ткани в регенерате. Так, в зоне А все контролируемые факторы на 83.93 % определяли количество костной ткани, причем степень влияния обоих параметров была практически равной. В зоне Б контролируемые факторы на 50 % влияли на изменение ДКТ. Важно отметить, что в зонах В и Г, несмотря на небольшой уровень ДКТ, особенно значимо совместное влияние контролируемых факторов.

Полученные данные позволяют заключить, что пересадка культуры аутогенных остеогенных клеток костного мозга оказывает заметное влияние на течение репаративного процесса в теменных костях. Основные различия репаративного остеогенеза у животных разных экспериментальных групп заключаются не только в более раннем формировании костного регенерата, его минерализации, но и в протекании адаптивной фазы — ремоделирования, которое у животных контрольной группы приводит к резорбции воссозданной кости и формированию на месте дефекта соединительнотканного рубца, а у животных II и III групп — к восстановлению кости.

В целом репаративный процесс у животных II группы отличался от контроля более ранним наступлением остеогенеза — к 15-м сут. Кроме того, характерны и качественные различия в этом процессе. Наличие сформированных первичных остеонов свидетельствует в пользу того, что

пересаженная культура способна корректировать ход репаративного остеогенеза. Ее воздействие можно обозначить как оптимизирующее — приближение хода процесса по своим временным характеристикам к возможному оптимуму. Исходя из полученных данных следует сделать заключение о том, что пересадка взвеси культуры костномозговых клеток индуцирует процессы остеогенеза.

Согласно полученным результатам, пересаженные клетки индуцируют пролиферацию и дифференцировку рассредоточенного остеогенного камбия в костной ране. Коллагеновый гель создает дополнительный трехмерный матрикс, который необходим остеогенным клеткам для реализации остеобластических потенций, изначально моделирует их расположение в формирующемся регенерате подобно их естественной архитектонике в составе костного мозга.

Таким образом, результаты работы позволяют считать, что трансплантация культуры остеогенных клеток для оптимизации течения репаративного остеогенеза в теменных костях приводит к заметному увеличению специализированной ткани в регенерате, заполняющем костный дефект. Выявлена особенность, заключающаяся в том, что активный процесс репаративного остеогенеза впервые 15—30 сут угасает к 90—120-м сут.

Введение культуры клеток также приводит к изменению динамики остеогенеза. Особенно наглядно это выявляется при сравнении ДКТ в зонах А регенераторов у

Оценка степени влияния (K_j , %) факторов на ДКТ в зонах дефекта на этапах заживления дефекта теменной кости

Факторы	Зоны дефекта			
	А	Б	В	Г
Фактор А (время)	38.09	22.69	26.08	32.48
Фактор В (трансплантация культуры клеток)	36.07	19.77	31.23	19.05
А×В (взаимодействие факторов)	9.77	7.54	28.46	26.32
Контролируемые факторы	83.93	50.00	85.79	77.85
Неконтролируемые факторы	16.07	50.00	14.21	22.15
Всего ^а	100.00	100.00	100.00	100.00

^а За 100 % принимали совокупность доли участия контролируемых и неконтролируемых факторов в изменении величины ДКТ в составе регенерата.

животных трех групп. Та же тенденция стойкого увеличения ДКТ сохраняется и в зоне Б. В центральных же участках дефекта — зонах В и Г — динамика несколько иная. У животных III группы вновь образованная костная ткань появляется раньше, однако ее количество практически на всех этапах уступает ДКТ во II группе. Вместе с тем после трансплантации клеток во всех зонах сохраняется общая тенденция к приросту ДКТ, тогда как в контроле и после введения взвеси клеток динамика либо неустойчива, либо имеет тенденцию к снижению.

Существенным фактором является то, что результаты опытов с мечеными клетками культуры позволяют рассматривать не только остеоиндуцирующий механизм действия пересаженных клеток, что было показано ранее (Фатхудинов и др., 2005), но и непосредственное их участие в остеогистогенезе. Пересаженные клетки сохраняют жизнеспособность в течение первых 18 сут, т. е. в период, когда в ране происходят активные процессы воспаления, диффузно встраиваются в регенерат и участвуют в восстановительном костеобразовании.

Использованная методология позволила уточнить основные этапы посттравматического остеогистогенеза при дефектах теменных костей, установить действенный способ оптимизации этого процесса (внесение культуры аутогенных костномозговых стромальных клеток после индукции направленной остеогенной дифференцировки) и добиться заживления дефектов в более короткие сроки.

Результаты, полученные во II и III группах с трансплантацией взвеси культивированных клеток и клеток в коллагеновом геле, в целом демонстрируют оптимизирующее влияние на репаративный остеогистогенез. Пересаженные клетки являются не только индукторами собственных остеогенных камбиальных элементов кости, но еще служат источниками и непосредственными участниками регенерационного остеогенеза, сохраняя свою жизнеспособность.

Последующее внедрение в клиническую практику методов клеточных биотехнологий может быть одним из направлений при выборе способов лечения пациентов с костной патологией. Этот путь согласуется с современными концепциями, существующими в фундаментальной гистологии, травматологии и ортопедии, по использованию методов оптимизации репаративной регенерации костной ткани (Шаповалов и др., 1999; Дулаев и др., 2003; Гололобов, 2004).

Таким образом, посттравматическая регенерация костей крыши черепа характеризуется особенностью, заключающейся в преходящем костеобразовании, в ходе которого активный остеогистогенез в течение 15—30 сут сменяется заместительным развитием волокнистой соединительной ткани. Трансплантация в область дефекта культуры костномозговых стромальных клеток после индукции направленной остеогенной дифференцировки оптимизирует остеогистогенез, способствует формированию пластинчатой костной ткани с последующим восстановлением органотипической архитектоники костных балок.

Пересадка культивированных остеогенных клеток костного мозга в коллагеновом геле вызывает увеличение (до 30 %) ДКТ в составе регенерата по сравнению с контролем через 120 сут.

Использование костномозговых стромальных клеток для оптимизации течения восстановительного остеогенеза при повреждениях плоских костей перспективно для клинических испытаний как один из методов выбора у пациентов с травмами и заболеваниями опорно-двигательного аппарата.

Список литературы

- Воронкина И. В.* 2003. Модуляция функциональной активности клеток и белков внеклеточного матрикса в процессе регенерации тканей под действием матриксных металлопротеиназ: Автореф. канд. дис. СПб. 26 с.
- Гололобов В. Г.* 1997. Регенерация костной ткани при заживлении огнестрельных переломов. СПб.: Петербург XXI. 160 с.
- Гололобов В. Г.* 2004. Посттравматическая регенерация костной ткани. Современный взгляд на проблему. Тр. ВМедА. 257: 94—109.
- Деев Р. В., Николаенко Н. С., Цупкина Н. В., Гололобов В. Г., Патокин И. Л., Пинаев Г. П.* 2004. Формирование и морфофункциональная характеристика остеобластического фенотипа в клеточных культурах *in vitro*. Цитология. 46 (3): 185—190.
- Дулаев А. К., Гололобов В. Г., Деев Р. В., Николаенко Н. С., Цупкина Н. В., Пинаев Г. П.* 2003. Остеогенные клетки и их использование в травматологии. Мед. академич. журн. 3 (3): 59—66.
- Зорин В. Л., Крашенинников М. Е., Фролов В. И., Онищенко Н. А., Расулов М. Ф., Вишневская Я. В.* 2004. Способ восстановления целостности дефектов длинных трубчатых костей с использованием мезенхимальных стволовых клеток. Вестн. трансплантологии и искусственных органов. 1: 37—40.

Кругляков П. В., Соколова И. Б., Зинькова Н. Н., Вийде С. В., Чердиченко Н. Н., Кислякова Т. В., Полицев Д. Г. 2005. Влияние сингенных мезенхимальных стволовых клеток на восстановление костной ткани у крыс при имплантации деминерализованного костного матрикса. Цитология. 47 (6) : 466—476.

Матвеева А. И. 1962. Замещение дефектов костей черепа регенерирующей костью. М.: Изд-во АН СССР. 136 с.

Николаенко Н. С., Цупкина Н. В., Деев Р. В., Паточкин И. Л., Лысенко Л. Н., Орлов В. П., Гололобов В. Г., Пинаев Г. П. 2004. Культивирование остеогенных клеток различного происхождения на биоситаллах силикоалюмофосфатной группы с целью создания остеозамещающих имплантатов. Клеточные культуры: информационный бюллетень. 19 : 10—16.

Саргсян А. А. 1990. Восстановление костных дефектов с помощью трансплантации культуральных штаммов костномозговых фибробластов в условиях эксперимента: Автореф. канд. дис. М. 20 с.

Саркисов Д. С., Перов Ю. Л. (ред.). 1996. Микроскопическая техника: руководство. М. Медицина. 427 с.

Фатхудинов Т. Х., Гольдштейн Д. В., Пулин А. А., Шамеников Д. А., Ржанинова А. А., Горностаева С. А., Григорян А. С., Кулаков А. А. 2005. Особенности репаративного остеогенеза при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Бюл. эксперим. биол. мед. 140 (6) : 109—113.

Шаповалов В. М., Ерохов А. Н., Ткаченко С. С. 1999. Современные проблемы восстановительного лечения раненых и больных ортопедо-травматологического профиля. Тр. ВМедА. 248 : 518—523.

Юнкеров В. И., Григорьев С. Г. 2002. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА. 266 с.

Gurevitch O., Gowda B., Kurkalli S., Prigozhina T., Kasir J., Gaft A., Slavin S. 2003. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. Stem Cells. 21 : 588—597.

Lendeckel S., Jödicke A., Christophis P., Heidinger K., Wolff J., Fraser J. K., Hedrick M. H., Berthold L., Howaldt H. P. 2004. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. J. Cranio-Maxillofacial Surgery. 32 : 370—373.

Mankani M. H., Krebsbach P. H., Satomura K., Kuznetsov S. A., Hoyt R., Robey P. G. 2001. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. Arch. Surg. 136 : 263—270.

Report of the AVMA panel on euthanasia. 2001. JAVMA. 218 (5) : 669—696.

Schaefer D. J., Klemm C., Zhang X. H., Stark G. B. 2000. Tissue engineering with mesenchymal stem cells for cartilage and bone regeneration. Chirurg. 71 : 1001—1008.

Shang Q., Wang Z., Liu W., Shi Y., Cui L., Cao Y. 2001. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. J. Craniofac. Surg. 12 : 586—593.

Veda M., Tohrai I., Nakai H. 2001. Tissue engineering research in oral implant surgery. Artif. Organs. 25 : 164—171.

Поступила 23 IV 2007

THE INFLUENCE OF TRANSPLANTED CULTURE OF BONE MARROW STROMAL CELLS ON REPARATIVE OSTEOHISTOGENESIS IN PARIETAL BONE DEFECT

R. V. Deev,¹ N. V. Tsupkina,² V. G. Gololobov,¹ N. S. Nikolaenko,² D. E. Ivanov,¹ A. K. Dulaev,¹ G. P. Pinaev²

¹ Russian Military Medical Academy and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: romdey@inbox.ru

Recently the problem connected with transplantation of bone marrow stromal cells for optimization of reparative osteogenesis is very actively studied. However, the objective methods allowing to observe the behavior of transplanted cells in a bone wound and to estimate character of regenerative osteogenesis after cell transplantation are used in an insufficient measure in both experimental and clinical researches. The aim of this study is to clarify the fate of stromal cells in a bone wound and to investigate the influence of bone marrow stromal cells on the process of posttraumatic osteogenesis after cell transplantation in parietal bone defect. The experiments were carried out on 38 rabbits with artificially made parietal bone defect (diameter 1.0 cmm). The rabbits were divided into three groups: the first group was a control one; the rabbits of the second group were injected autogenic cultivated bone marrow stromal cells (10^6); the rabbits of the third group were injected with autogenic cultivated bone marrow stromal cells (10^6) in collagn gel. The methods of light and fluorescent microscopy, histomorphometry and statistical treatment of the data were used to estimate the results. The obtained data showed that transplanted cells were viable at least during 18 days after transplantation and efficiently took part in the reparative process. The transplantation of cultivated bone marrow stromal cells in collagen gel caused 30 % increase in the part of bone tissue in the bone regenerate tissue in comparison with control after 120 days.

Key words: stromal cells, cell culture, reparative osteogenesis, bone defect, cell transplantation.