

УДК: 616.718.4- 001.5:599.23+ 616.71-018.46-089.843  
© Шимон В.М., Шерегій А.А., 2010

## ДИФЕРЕНЦІЙОВАНИЙ ПІДХІД ДО ОСТЕОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ В ДЕФЕКТ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Шимон В.М., Шерегій А.А.

*Ужгородський національний університет, медичний факультет*

**Шимон В.М., Шерегій А.А.** Дифференційований підхід до остеогенної активності трансплантованих клітин кісткового мозку в дефект стегнової кістки щурів різного віку // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №3. – С. 164-165.

В роботі проведено порівняльний аналіз остеогенної активності аутологічних стромальних клітин кісткового мозку щурів різного віку при трансплантації їх в дефект стегнової кістки. У культурах клітин молодих щурів кількість новоутворених колоній була вірогідно вищою за показники культур старих щурів, а остеогенна активність стромальних клітин кісткового мозку молодих щурів перевищувала аналогічні показники стромальних клітин кісткового мозку старих щурів у 13,7 разів.

**Ключові слова:** клітини кісткового мозку, остеогенна активність, кістковий дефект.

**Шимон В.М., Шерегій А.А.** Дифференцированный подход к остеогенной активности трансплантированных клеток костного мозга в дефект бедренной кости крыс разного возраста // Украинский морфологический альманах. – 2010. – Том 8, №3. – С. 164-165.

В работе проведен сравнительный анализ активности аутологических стромальных клеток костного мозга крыс разного возраста при трансплантации их в дефект бедренной кости. 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.

**Ключевые слова:** клетки костного мозга, остеогенная активность, костный дефект.

**Shimon V.M., Shereghy A.A.** Ambiguous approach for osteogenic activity of the transplanted bone marrow cells into the different of age experimental rats hip bone defect // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №3. – С. 164-165.

In our research 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.

**Key words:** bone marrow cells, osteogenic activity, bone defect.

**Вступ.** Проблема реактивності і регенерації кісткової тканини і розробка питань направлено впливу на процеси загоєння кістки залишається однією з актуальних проблем медицини сьогодення. Гостро стоїть питання репаративної регенерації кісткової тканини серед проблем ортопедії та травматології.

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 перевершнуючим допустимі межі фізіологічної регенерації, та направлений на відновлення анатомічної цілості і забезпечує функції кістки [7]. Прогрес в розвитку травматології та ортопедії, як науки, пов'язаний здебільшого з розробкою та вдосконаленням різноманітних технологічних конструкцій для з'єднання кісткових відламків. В цьому напрямку досягнуті певні успіхи, однак ряд питань, пов'язаних з так званою "остеогенною недостатністю", залишаються відкритими [5-8].

Однією із основних задач хірурга є пошук та забезпечення найбільш оптимальних умов для протікання репаративних процесів при порушенні цілості кісткової тканини. Ряд експериментів на тваринах указує на те, що навіть при умові точного співставлення кісткових уламків та утримання їх в положенні репозиції 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 морфогенетичним білкам [6]. На сьогоднішній день активно розвивається новий напрям регенеративної 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]. Клітини на матрицях використовують для відновлення проблемних пошкоджень кістки – багатуламкові 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 з дефіцитом йоду, збільшенням вмістом фтору, радіаційним фоном тощо. Доведена низька регенераторна активність у пацієнтів з цукровим діабетом, при нейрофіброматозі та ін-

пних захворювань. У зв'язку з цим, дослідники звертають увагу на біологічні стимулятори остеогенезу, а саме, на застосування культивованих остеопрогеніторних клітин.

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

**Матеріал і методи.** Кістковий мозок отримували із великої 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  $1 \text{ см}^2$  площі флакона і культивували у живильному середовищі (DMEM із L-глутаміном, 10% телячої сироватки, 100 IU/мол пеніциліну, 100 мкг/мол стрептоміцину) у  $\text{CO}_2$  інкубаторі при температурі  $37^\circ \text{C}$  у середовищі з 5 %  $\text{CO}_2$  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 MICROSCOPE. Морфометричні дослідження тканин регенерату проводили на 14 добу за методом Автандилова Г.Г. [1].

Утримання і догляд за тваринами та всі маніпуляції проводились 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 спостерігалася утворення клітинних колоній. Проте, якщо у культурах клітин кістково-

го 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 – спостерігалася фіброретикулярна та грубо-волокниста 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. Регенерация кости: достижения та перспективы / 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. Кочин, 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 электро-стимуляции остеорепації // 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., Шеретий 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. – 1996. – Vol.32. – №30. – P.341-348.