

© Коллектив авторов, 2014
УДК 616-092

А.А. Орлов, И.Н. Сабурина, С.Д. Сысоев, А.С. Григорьян

Влияние трансплантации аутогенных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани на течение остеогенетического процесса (экспериментальное исследование)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук. 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

На 48 крысах Вистар с помощью гистоморфологического метода прослежена динамика остеогенетического процесса в области аутокостного трансплантата из большеберцовой кости при его фиксации на поверхности нижней челюсти и введении в область операции взвеси из аутогенных стволовых клеток из жировой ткани в первой группе животных (основная группа), и без введения МСК во второй группе (группе сравнения). Сроки наблюдений: 21, 60, 120 и 180 суток, по 6 крыс на точку наблюдений в каждой из групп. Проведенное исследование продемонстрировало выраженную интенсификацию остеогенетического процесса в основной группе опыта, и как следствие этого, слияние костных образований в единое целое. В группе сравнения во все сроки наблюдений между аутокостным трансплантатом и нижнечелюстной костью обнаруживались обширные поля грубоволокнистой соединительной ткани.

Ключевые слова: аутогенные стволовые клетки из жировой ткани, стимуляция остеогенеза, костный аутоотрансплантат

A.A. Orlov, I.N. Saburina, S.D. Sisoev, A.D. Grigorian

Influence of transplantation of autogenic mezenhymal stem cells from the fatty tissues on osseogenic process (experimental research)

Institute of general Pathology and Pathophysiology, RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

In experiments on 48 rats of line Wistar, divided at 2 groups (first — basic group and 2-d group — group of comparison) through the use of morphological method was researched influence of mesenchymal stem cells (MSC) inoculated in the arrear of autogenic bone graft from tibia fixed at the surface of the jaw. The animals of group of comparison didn't get MSC. Time frames of watching: 21, 60, 120 and 180 days, 6 rats on the point of experiment in either of the two of the group. Data of this research had shown the intensification of bone formation process in the basic group of experiment under the action of the inoculation of autogenic MSC from adipose tissue, and as consequence of it, in eventual, merge of bone formations in a single entity.

Key words: Autogenic mezenchymal cells from an adipose tissue, stimulation bone formation, osseo genesis, bone graft

Одной из актуальных проблем современной теоретической и клинической медицины является развитие новых наукоемких лечебных технологий, к числу которых, несомненно, относятся методы, основанные на применении клеточных технологий.

С тех пор, как А.Я. Фриденштейн с соавторами [3] описали мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга человека, которые рассматриваются как основные источники клеточного пула для постоянного обновления и регенерации костной ткани, наука прошла значительный путь развития. Решающим вкладом в развитие этого направления исследований явились работы, продемонстрировав-

шие образование эктопических очагов костеобразования и существенное ускорение процесса заживления обширных костных дефектов при инокуляции животным МСК [3, 7, 9].

За минувшее время клеточные технологии шагнули далеко вперед. Были разработаны новые методы и источники получения стволовых клеток, в том числе из жировой ткани, что актуально в свете настоящего исследования.

Если в прошлом чуть ли не единственным источником для МСК признавался костный мозг, то в последние годы речь идет о том, что МСК располагаются практически во всех тканевых субстратах взрос-

лого человека и животных. Они обнаружены и выделены из жировой ткани, скелетных мышц, связок, из трабекулярной кости [2, 4, 6].

Эти данные в определённой степени поддерживают концепцию существования мультилинейарного резерва в виде стволовых клеток на протяжении постнатальной жизни человека и животных [1, 2, 5].

Раскрыты тонкие (на молекулярном уровне) механизмы работы МСК и тех взаимодействий, которые осуществляются при их непосредственном участии [5, 6, 8, 10].

Проведенное нами исследование направлено на решение принципиально важных задач современной травматологии и ортопедии, разработку средств и методов стимуляции остеогенетического процесса при дефиците костной ткани, в том числе в области альвеолярного отростка челюсти, что актуально для ортопедической стоматологии.

Цель исследования: совершенствование средств и методов лечения дефицита костной ткани в области альвеолярного отростка посредством использования липогенных МСК и костного аутоотрансплантата.

Методика

Задачи исследования:

1. Исследовать с помощью гистоморфологического метода динамику развития костеобразовательного процесса в области трансплантации подопытным животным (крысы) аутоотрансплантата из большеберцовой кости на поверхность нижней челюсти при инокуляции им в область операции аутогенных МСК из жировой ткани.

2. Рассмотреть на основе результатов собственных наблюдений степень влияния инокуляции МСК на активность клеточных элементов участвующих в остеогенетическом процессе.

3. Исследование характера и выраженности таких компонент регенерации как пролиферация остеогенных клеток и их созревание, а также процессов резорбции костного вещества, и перехода структуры костного матрикса от грубоволокнистого характера к пластинчатому в условиях проводимого эксперимента.

4. Проследить в сроки от 21 до 180 суток характер процессов новообразования и ремоделирования вновь образованной костной ткани при введении подопытным животным липогенных МСК в области трансплантации подопытным животным костного аутоотрансплантата при инокуляции им в область операции аутогенных МСК из жировой ткани.

5. Экспериментально обосновать целесообразность и эффективность применения в клинике ортопедической стоматологии аутогенных МСК из жировой ткани на этапах подготовки пациентов к дентальной имплантации.

При анализе гистологических картин мы стремились провести оценку костеобразовательного процесса в области контакта аутокостного материала и материнской кости посредством определения интенсивности костеобразовательного процесса по:

- активности образования новых костных трабекул;
- гистологической характеристике остеобластов (с точки зрения проявления их функциональной активности);
- по наличию напластований новообразованных костных трабекул на костные фрагменты, как проявление остеогенетической активности;
- по степени зрелости новообразованных костных структур на этапах экспериментальных наблюдения.

Выделение МСК жировой ткани. Образцы жировой ткани выделяли из паховой области животных, гомогенизировали и разводили втрое фосфатным буфером Дульбекко (ФБД) и интенсивно встряхивали на вортексе в течение 2—3 мин. После центрифугирования (10 мин при 600g) жировое кольцо и супернатант удаляли, а осадок из стромальных клеток ресуспендировали в среде культивирования.

Клеточные суспензии разводили вдвое фосфатным буфером Дульбекко (ФБД) и насливали на градиент плотности Histopaque 1.077 («Sigma»).

После центрифугирования в течение 30 мин при 400g интерфазные мононуклеарные кольца отбирали в отдельные пробирки и отмывали центрифугированием в избытке ФБД. Полученные клеточные осадки ресуспендировали в среде культивирования и высевали во флаконы (T25; «Coming») [2].

Культивирование МСК жировой ткани. Среду с неприкрепившимися клетками удаляли, культуры бережно отмывали ФБД и заменяли среду культивирования на свежую. Дальнейшие смены среды проводили через 2—3 сут. По мере роста и достижения субконфлюентного состояния клетки снимали трипсином-ЭДТА («Gibco») и пересевали в новые флаконы с разведением 1:3—1:10. Использовали культуры 3—7 пассажей [2].

Методика эксперимента. Эксперимент был проведен на крысах Вистар массой 200—220 г. Животных разделили на 2 равные группы: основную группу и группу сравнения.

Способ введения МСК: 1-е введение в день операции посредством инъекции в область операции, 2-е введение — на 10-е сутки после операции, область операция обкальвали в 4-х точках.

Количество МСК на 1 введение на крысу составляло $3,5-6,7 \times 10^6$ в 0,4 мл физиологического раствора.

Первый хирургический этап

Забор аутоотрансплантата из правой большеберцовой кости (Tibia). Наркоз: кетамин с ксилазином (1:1

по объему в одном шприце) из расчета 0,15 мл препарата на 100 г массы животного. Операционное поле освобождали от шерсти. Производили разрез по передней поверхности голени от дистальной части симфиза коленного сустава над Tibia длиной приблизительно 1,5 см. Далее — рассечение футлярно-надкостничной перемычки верхней трети Tibia. Производили скелетирование участка кости 2×2 мм фрезой с охлаждением (физраствор) на глубину 1,5 мм. Выпиливали участок кости (аутотрансплантат). Костный дефект в Tibia пломбировали хирургическим воском BONEWAX фирмы Ethicon.

Аутотрансплантат помещали в стерильный физиологический раствор. Рану послойно ушивали (Викрил 5,0). По ходу операции проводили гемостаз.

Второй хирургический этап

На втором этапе производили пересадку свободного аутотрансплантата Tibia на наружную поверхность тела и ветви нижней челюсти с его фиксацией титановым микровинтом (L 5 м, D 1,2 мм).

Проводили разрез кожи и подкожно-жировой клетчатки по краю тела нижней челюсти слева. Тупым путем отводили в стороны поверхность и глубоко лежащие сосуды. Далее расслаивали жевательную мышцу, скелетировали наружную поверхность области тела и ветви нижней челюсти и производили остеопластику в этой области размером 3×3 мм. Создавали перфорационное отверстие в кости нижней челюсти и в аутотрансплантате с охлаждением (физраствор). Аутотрансплантат фиксировали титановым винтом. При этом красный костный мозг аутотрансплантата контактировал с воспринимающим ложем нижней челюсти. Рану послойно ушивали (Викрил 5,0). По ходу операции осуществляли гемостаз.

Животным внутримышечно вводили антибиотик Байтрил (Эндофлуксацин) 5% по 0,1 мл на животное из расчета примерно 10 мг/кг. В дальнейшем антибиотик вводили повторно на 2 сутки после дня операции.

Животных выводили из эксперимента на 21, 60, 120 и 180 сутки после операции по 3 животных на точку наблюдения.

Методика гистологического исследования

Выделяли костные образования из области операции и фиксировали их в 10% нейтральном формалине. Костную ткань декальцинировали в 25% Трилоне Б и заливали в парафин. Серийные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизон.

Результаты исследования

Как показало проведенное исследование, в сроки 21 сутки опыта ведущим процессом в области транс-

плантации аутокостного материала на челюстную кость с инокуляцией в область операции аутогенной культуры МСК, полученной из жировой ткани, явился процесс активного остеогенеза в зоне трансплантации, причём как в области материнской кости, так и по краям аутотрансплантата, а также костных осколков (рис. 1А на 2-й странице обложки).

Между этими зонами активного остеогенеза располагалась соединительнотканная прослойка, которая как бы разграничивала эти два «нуклеуса» клеточной остеогенетической активности.

В группе сравнения, где отсутствовало поддерживающее остеогенез воздействие МСК остеогенетическая активность либо отсутствовала, либо была чрезвычайно низкой. Помимо этого наблюдались и цитологические признаки низкой компетентности указанных клеток. Они, как правило, были мелкими и иррегулярными по своему расположению у краёв костных трабекул, которые в этой группе наблюдений и сами по себе были крайне скудно и нерегулярно представлены в области контакта аутокостный трансплантат — материнская кость (рис. 1Б на 2-й странице обложки).

Исследование материала 60-е сут. опыта свидетельствовало о том, что инокуляция липогенных МСК значительно повышала интенсивность образования новых костных трабекул и способствовала заполнению пространства между аутокостным трансплантатом и материнской костью новообразованным костным веществом. Вновь образованная кость проявляла тенденцию к компактизации, нередко при сохранении её грубоволокнистого характера. Отмечалось появление участков с более высоким уровнем дифференциации костной ткани, вплоть до образования некоторых количеств остеонных систем, однако, ещё иррегулярных. В одном из наблюдений отмечалось образование плотного соединения между аутотрансплантатом и материнской костью (рис. 2 на 2-й странице обложки).

На значительных пространствах наблюдалось отложение остеоидного вещества, что свидетельствовало о чрезвычайно высокой интенсивности костеобразовательного процесса.

Вновь образованное незрелое костное вещество характеризовалось высокой насыщенностью клеточными элементами, с преобладанием молодых и активно синтезирующих остеобластов.

В группе сравнения костеобразовательный процесс был выражен очень слабо, либо отсутствовал вовсе. Клеточные элементы в группе сравнения характеризовались признаками низкой синтетической активности, они были мелкими, их количество было снижено и располагались эти клетки иррегулярно.

На 120-е сут. опыта анализ гистологических картин показал, что в группе с инокуляцией МСК (основная группа) во всех случаях в пространстве между аутоотрансплантатом и материнской костью формировалась новая костная ткань, которая спаивала аутокостный трансплантат и материнскую кость в единое костное образование. Новообразованная костная ткань, как правило, имела склонность к компактизации. Местами для новообразованной костной субстанции была характерна высокая насыщенность клеточными элементами, что, соответствовало характеристике этих участков как молодого низко дифференцированного костного вещества.

Даже в случае сохранения в области контакта двух костных формаций, разделенных фиброзной прослойкой (1 наблюдение), по их краям отмечалось интенсивное новообразование костных трабекул.

В группе сравнения отмечалась чрезвычайно низкая остеогенная активность, что, в частности, выражалось в малом количестве новых трабекул либо полном их отсутствии между ауто- и материнской костью. Обширные территории этого пространства были заняты грубоволокнистой соединительной тканью (рис. 3 на 2-й странице обложки).

При этом отмечалось, что ткань аутоотрансплантата не оставалась интактной, в ней происходило запустевание значительной части клеточных лагун, что должно расцениваться, как проявление альтерации.

Следует подчеркнуть, что в основной группе опытов наблюдалась определённая завершенность процесса дифференциации новообразованной костной субстанции. В этом состояло одно из важных следствий инокуляции в область операции на ранних этапах опыта мезенхимальных стволовых клеток. Дериваты этих клеток, по-видимому, сохранились на поверхности аутоотрансплантата и проявили себя в отдаленные сроки эксперимента, детерминируя продолжение процесса остеогенеза и вторичную перестройку (ремоделирование) вновь образовавшегося в пространстве между аутокостным трансплантатом и материнской костью костного вещества.

Сопоставление гистологических картин в основной группе и в группе сравнения свидетельствовало о том, что различия между ними касаются не только количества вновь образованных костных структур, но также и качественных характеристик нового костного вещества, которое в основной группе в отдаленные сроки наблюдений местами приобретало пластинчатое строение с развитием остеонных систем.

В группе сравнения наблюдалось очень слабое или практически полное отсутствие проявлений остеогенетических процессов, как в плане новообразования костных структур, так и структурных характеристик остеобластических элементов. Их количество было снижено, они

были уменьшенными в размерах и располагались вдоль костного края, зачастую изъеденного в результате резорбции, с нерегулярными перерывами.

Заключение

Как показало проведенное исследование, в основной группе, животным которой инокулировали в область операции липогенные МСК, начиная с 21 суток, в пространстве между аутоотрансплантатом и материнской костью происходило интенсивное построение новых костных трабекул.

Цитологические характеристики остеобластических элементов, новообразованных костных структур в пространстве между материнской костью и аутоотрансплантатом свидетельствовали о высокой синтетической активности этих клеток.

На 60-е сутки опыта в результате пролиферации остеогенных клеток в основной группе у костных краев наблюдалось образование широкого пласта из указанных клеток, который отграничивался от окружающих тканевых элементов тонкой соединительнотканной пластинкой.

В основной группе опытов, начиная с 60-х суток опыта (1 животное), а в последующем — у подавляющего их числа, в результате активных остеогенетических процессов, в пространстве между аутоотрансплантатом и материнской костью происходило спаивание указанных костных образований в единое целое.

По мере увеличения сроков наблюдения, новообразованное костное вещество в пространстве между аутокостным трансплантатом и материнской костной тканью подвергалось дифференциации. Это выражалось в превращении его матрикса в части случаев из грубоволокнистого в пластинчатый с развитием остеонных систем.

В группе сравнения, животным которой не вводили МСК, в пространстве между аутоотрансплантатом и материнской костью формировались обширные поля фиброзной соединительной ткани, которые прослеживались во все сроки наблюдений.

Данные настоящего исследования демонстрируют высокий уровень стимулирующего действия аутогенных МСК из жировой ткани на процессы остеогенеза, что свидетельствует о целесообразности их применения при дефиците костной ткани в области альвеолярного отростка на этапе подготовки пациентов к дентальной имплантации.

Данные, представленные в настоящем исследовании, в определенной мере согласуются с результатами проведенных ранее работ [1, 2]. В частности, было продемонстрировано, что мезенхимальные стволовые клетки осуществляют важную для поддержания жизнедеятельности организма, в том числе при патогенных воздействиях, защитную/протекторную функцию [10, 11].

Список литературы

1. Кулаков А.А., Григорьян А.С., Киселева Е.В. с соавт. Устранение критических костных дефектов с помощью биоинженерной конструкции на нерезорбируемой полимерной основе с использованием аутогенных мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани // Стоматология. — 2010. — №3. — С. 9-12.
2. Сабурова И.Н. Эпителио-мезенхимальная пластичность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в норме и патологии (экспериментальное исследование): Автореф. дисс. д.б.н. — М., 2010.
3. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Проллиферативный и дифференцировочный потенциал скелетогенных колонеобразующих клеток костного мозга // Цитология. — 1986. — Т. 28, №3. — С.341-349.
4. Bianco P., Cao X., Frenette P.S. et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine // Nature Medicine. — 2013. — Vol. 19. — P. 35-42.
5. Phinney D.G. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy // Journal of Cellular Biochemistry. — 2012. — Vol. 113. — P. 2806-1282.
6. Deng Z.L., Sharff K.A., Tang K.A. et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development // Frontiers in Bioscience. — 2008. — Vol. 13, №6. — P. 2001-2021.
7. Dennis J.I., Haynesworth S.E., Young R.G., Caplan A.I. Osteogenesis in marrow derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously; effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenesis expression // Cell. Transplant. — 1992. — Vol. 1. — P. 123-232.
8. Ducy P., Zhang, Geoffroy R.V., Ridall A.L., Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation // Cell. — 1997. — Vol. 89, №5. — P. 747-754.
9. Ohguslu I.I., Goldberg V.M., Caplan A.I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells // J. Orthop. Res. — 1989. — 7 (4). — P. 568-578.
10. Pankaj K., Blanpain C., Rossi D.J. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences // Nature Reviews Molecular Cell Biology. — 2011. — Vol. 12. — P. 198-02.
11. Timmers L., Lim, S.K., Arslan F., Armstrong, J.S., Hofer, I.E., Doevendans, P.A., Piek, J.J. El Oakley, R.M., Choo, A., Lee, C.N., Pasterkamp, de Kleijn G. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium // Stem Cell Research. — 2008. — Vol. 1. — Issue 2. — P. 129-137.

Поступила 13.11.13

Сведения об авторах:

Орлов Андрей Алексеевич, д.м.н., проф. зав. отделением Трансляционной медицины, Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН; главный врач частной стоматологической клиники «Академическая стоматология»

Сабурова Ирина Николаевна, д.б.н., зав. лабораторией новых клеточных технологий, Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН

Сысоев Сергей Дмитриевич, зав. отделением
Григорьян А.С.