

© Коллектив авторов, 2015
УДК 616-092.4

Григорьян А.С.¹, Орлов А.А.², Сабурин И.Н.^{2,3}, Зурина И.М.², Сысоев С.Д.²

Динамика остеогенетического процесса, вызванного инокуляцией аутологичных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани крысы (экспериментально-морфологическое исследование)

¹ — ФГБУ Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, 119991, Москва, ул. Тимура Фрунзе, 16

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

³ — ГБОУ ДПО Российская Медицинская Академия Последипломного образования Минздрава России, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Исследование выполнено на 40 самцах крыс Вистар. На экспериментальной модели повреждения нижней челюсти костный аутографт из большеберцовой кости помещали на поверхность нижнечелюстной кости (материнская кость). 20 крысам основной группы в пространство между ними инокулировали аутологичные стромальные клетки из подкожной жировой ткани (СКЖТ). В группе сравнения использовали ту же экспериментальную модель без введения клеток. В основной группе между костным аутографтом и материнской костью наблюдали интенсивное новообразование фиброретикулярных костных структур, которые, в последующем, претерпевали вторичную перестройку и дифференцировку в процессе ремоделирования. В результате проведенного исследования установлено, что в основной группе к 180-м сут. происходило значимое снижение площади, занимаемой прежде гиперплазированным фиброретикулярным костным веществом. Описанный феномен, по-видимому, можно объяснить падением числа активных клеток в популяции инокулированных СКЖТ, которые, согласно концепции Хейфлика—Мурхеда, имеют предел числа делений за счет укорочения теломера.

Ключевые слова: стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ), костный аутографт, индукция остеогенеза, гиперплазия костной ткани, эффект Хейфлика—Мурхеда

Grigoryan A.S.¹, Orlov A.A.², Saburina I.N.^{2,3}, Zurina I.M.², Sysoev S.D.²

Dynamics of osteogenesis associated with inoculation of autologous stromal cells from rat adipose tissue (experimental-morphological study)

¹ — FSBI Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation, 16, Timura Frunze st., 119991, Moscow, Russia

² — FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., 125315, Moscow, Russia

³ — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1, Barrikadnaya st., 123995, Moscow, Russia

Experiment was evaluated on 40 male Wistar rats. On the experimental model of mandible injury, bone autologous graft from tibia was placed on the surface of mandible (host bone). In the main experimental group, consisting of 20 animals, autologous rat adipose-derived stromal cells (ADSCs) were inoculated in space between autograph and host bones. ADSCs were not inoculated in the group of comparison. In experimental group with inoculated cells, the formation of a new fibroreticular bone structures in space between autograph and host bone was observed. These structures further underwent secondary reorganization and differentiation during the process of remodeling. As a result of the conducted study it was shown that in the experimental group by the day 180, statistically significant reduction of the area occupied by an immature fibroreticular bone took place. The reported phenomenon could be explained as a result of decline of the number of active cells in the population of inoculated ADSC, which is in consent with theory of limited cell division number due to telomeres shortening, described by Hayflick L. and Moorhead P.S. (1961).

Key words: adipose-derived stromal cells (ADSCs), bone autograft, osteogenesis induction, bone tissue hyperplasia, Hayflick—Moorhead effect

Для корреспонденции: Григорьян Алексей Суренович, д.м.н., проф., консультант отдела общей патологии ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России

В настоящее время клеточные технологии рассматриваются как наиболее перспективные для применения в регенеративной медицине.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) рассматривают как основной источник клеток для обновления и регенерации костной ткани. Значительную роль в развитии этого направления исследований сыграли работы Caplan с соавторами, продемонстрировавшие образование эктопических очагов костеобразования и значительное ускорение заживления обширных костных дефектов при трансплантации кальций-фосфатной керамики, комбинированной с ММСК костного мозга [1]. В настоящее время еще одним более доступным источником ММСК является подкожная жировая ткань, содержащая стволовые и прогениторные клетки [2].

Цель исследования — изучение остеогенной эффективности аутологичных стромальных клеток из подкожной жировой ткани (СКЖТ) на различных сроках после их инокуляции. Для этого планировалось выявить, используя гистоморфологический метод, конкретные процессы жизненного цикла костной ткани, подверженные тем или иным изменениям под влиянием СКЖТ, а также оценка длительности остеостимулирующего эффекта аутологичных СКЖТ, инокулированных в пространство между костным аутооттрансплантатом и материнской костью (нижняя челюсть) подопытных животных.

Методика

Выделение стромальных клеток жировой ткани крыс (СКЖТ)

Клетки стромально-сосудистой фракции выделяли у 20 крыс по стандартному протоколу из ткани подкожного жира [3, 4]. Для этого, под общей анестезией (кетамин, 8 мг/100 г) рассекали кожу, отделяли гиподерму от мышц брюшной стенки, отрезали фрагмент подкожного жира, кожу зашивали. Извлеченный фрагмент жира помещали в стерильный транспортный контейнер в среду DMEM/F12 (Биолот) с добавлением глутамин (2 мМ L, Биолот) и гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко). Полученные образцы ткани отмывали от сгустков крови и волосяного покрова в растворе Хенкса (Биолот), содержащем антибиотики (1% пенициллин-стрептомицин, 400 ед/мл гентамицин, ПанЭко). Образцы ткани механически измельчали и ферментативно обрабатывали в растворе коллагеназы I типа (0,07%, ПанЭко) и диспазы (0,025%, ПанЭко) в течение 25 мин. После окончания инкубации в раствор с ферментами и ткань добавляли полную ростовую среду и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали

в полной среде и пропускали через нейлоновый фильтр, чтобы избавиться от крупных фрагментов ткани. Выделенные клетки вместе с ферментированными кусочками тканей помещали на чашки Петри (60 мм) в полную ростовую среду.

Культивирование СКЖТ

Культивировали клетки в стандартных условиях (37°C; 5% CO₂) в полной ростовой среде, состоящей из смеси базовых сред DMEM/F-12 (1:1, Биолот), дополненной 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл антибиотика (гентамицин, ПанЭко) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). Замену среды производили каждые 2 сут. Когда клетки достигали монослоя, осуществляли пересев культуры на новые чашки Петри (90 мм) с помощью раствора версена (Биолот) и 0,25%-ного раствора трипсина (Биолот). После четвертого пассажа культивирования в монослое СКЖТ трансплантировали экспериментальным животным.

Проточная цитофлуориметрия

Для анализа экспрессии основных поверхностных маркеров на клетках использовали метод проточной цитофлуориметрии. Данный метод основан на реакции антиген-антитело, при этом антитело конъюгировано с флуорохромом, что позволяет визуализировать и оценить экспрессию искомого белка качественно и количественно. В итоге таким образом можно определить количество клеток, относящихся к той или иной субпопуляции. С помощью 0,25% раствора трипсина и раствора версена получали суспензии диссоциированных клеток после первого и четвертого пассажа и инкубировали их с антителами к CD11b, CD14, CD19, CD29, CD31, CD45, CD90, CD105 и CD133 (Beckman Coulter). Полученные материалы анализировали на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter, США) с помощью программы CXP System. Количество МСК на 1 введение на крысу составляло 3,5—6,7 × 10⁶ в 0,4 мл физиологического раствора.

Хирургические операции

Эксперимент был проведен на 40 самцах крыс Вистар, массой 200—220 г. Животных разделили на 2 равные группы: основную группу, животным которой в пространство между костным аутооттрансплантатом (фрагмент большеберцовой кости) и материнской костью (нижняя челюсть) инокулировали СКЖТ, и группу сравнения, в которой животным не вводили клетки. Хирургическое вмешательство проводили в 2 этапа.

Первый хирургический этап — забор ауто трансплантата из правой большеберцовой кости (tibia). Анестезию осуществляли при введении кетамина и ксилазина (1:1 по объему в одном шприце) из расчета 0,15 мл препарата на 100 г веса животного. После действия наркоза проводили разрез по передней поверхности голени от дистальной части симфиза коленного сустава над большеберцовой костью длиной 1,5 см. Рассекали футлярно-надкостничную перемычку верхней трети tibia. Скелетировали участок кости 2 x 2 мм фрезой (с охлаждением физиологическим раствором) на глубину 1,5 мм. Выпиливали участок кости (ауто трансплантат). Костный дефект в tibia пломбировали хирургическим воском BONEWAX (Ethicon, США), после чего рану ушивали материалом Викрил 5,0.

Полученный ауто трансплантат помещали в стерильный физиологический раствор. По ходу всей операции осуществляли гемостаз.

Второй хирургический этап — пересадка свободного ауто трансплантата tibia на наружную поверхность тела и ветви нижней челюсти и фиксация его титановым микровинтом (L = 5 мм, D = 1,2 мм).

Производили разрез кожи и подкожно-жировой клетчатки по краю тела нижней челюсти, раздвигая мышцы и сосуды, осуществляли доступ к поверхности тела и ветви нижней челюсти. Кость скелетировали, производили остеотомию площадью 3 x 3 мм. Создавали перфорационное отверстие в кости нижней челюсти и в ауто трансплантате (с охлаждением физиологическим раствором). Ауто трансплантат фиксировали титановым винтом, после чего рану ушивали материалом Викрил 5,0. Антибиотик Байтрил 5% по 0,1 мл вводили внутримышечно дважды после операции из расчета на 10 мг/кг веса животного.

Основной группе животных дважды вводили суспензию СКЖТ: первое введение — инъекция в область операции в день операции; второе введение — на 10-е сут. после операции. Область хирургического вмешательства обкалывали в четырех точках. Количество клеток на каждое введение составляло 3,5—6,7 x 10⁶ клеток в 0,4 мл физиологического раствора на животное.

Гистологическое исследование

Животных выводили из эксперимента на 21-е, 60-е, 120-е и 180-е сут. после операции. Каждый костный блок, включающий костный ауто трансплантат и фрагмент материнской кости, декальцинировали в 25%-ном Трилоне Б и заливали в парафин. Срезы толщиной 8 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, либо пикрофуксином по Ван-Гизону с докрасиванием ядер железным гематоксилином по Вейгерту.

Для исследования и статистического анализа отбирали каждый 10-й срез. Таким образом, расстояние между исследуемыми срезами составляло порядка 50 мкм. Для каждой временной точки наблюдения (21-е, 60-е, 120-е, 180-е сут.) исследовали 20 срезов. Такой дизайн морфометрического исследования обеспечил репрезентативность полученного материала по группам и срокам экспериментов, позволил выявить с высокой степенью значимости корреляции между инокуляцией СКЖТ в область хирургического вмешательства и морфологическими проявлениями эффектов от введения СКЖТ. Полученные данные послужили основанием для заключения об остеогенном эффекте инокуляции аутологических СКЖТ в пространство между костным трансплантатом и материнской костью.

Проводили сопоставление интенсивности новообразования костного вещества (фиброретикулярная кость) в основной группе и группе сравнения.

Гистоморфометрическое исследование

Гистоморфометрический анализ проводили в соответствии с рекомендациями Автандилова Г.Г. (2002). На гистологических препаратах определяли долю площади в процентах, занимаемую следующими тканевыми структурами:

- 1) вновь образованное костное вещество — фиброретикулярная костная ткань;
- 2) зрелая пластинчатая костная ткань;
- 3) фиброзная или клеточно-волоконистая соединительная ткань.

Выбор перечисленных типов тканевых структур определялся следующими соображениями: во-первых, изучение динамики образования фиброретикулярной костной ткани позволяло количественно определить остеогенетическую активность введенных в область экспериментального воздействия СКЖТ; с другой стороны, по показателям интенсивности новообразования костного вещества в различные сроки эксперимента мы полагали возможным судить о длительности сохранения в области экспериментального воздействия инокулированных клеток.

В процессе анализа статистических показателей были произведены процедуры, позволившие, используя метод формализации, получить массивы числовых показателей, в качестве которых выступали процентные показатели — доли площади, занимаемой каждым из трех типов тканевых структур, избранных в качестве критерийных признаков. При сопоставлении полученных величин за их значимое различие принимали $t \leq 0,001$

Все статистические процедуры производили в аппарате программы Excel 2003 по критерию «Стьюдента». Статистическую значимость различий или вероят-

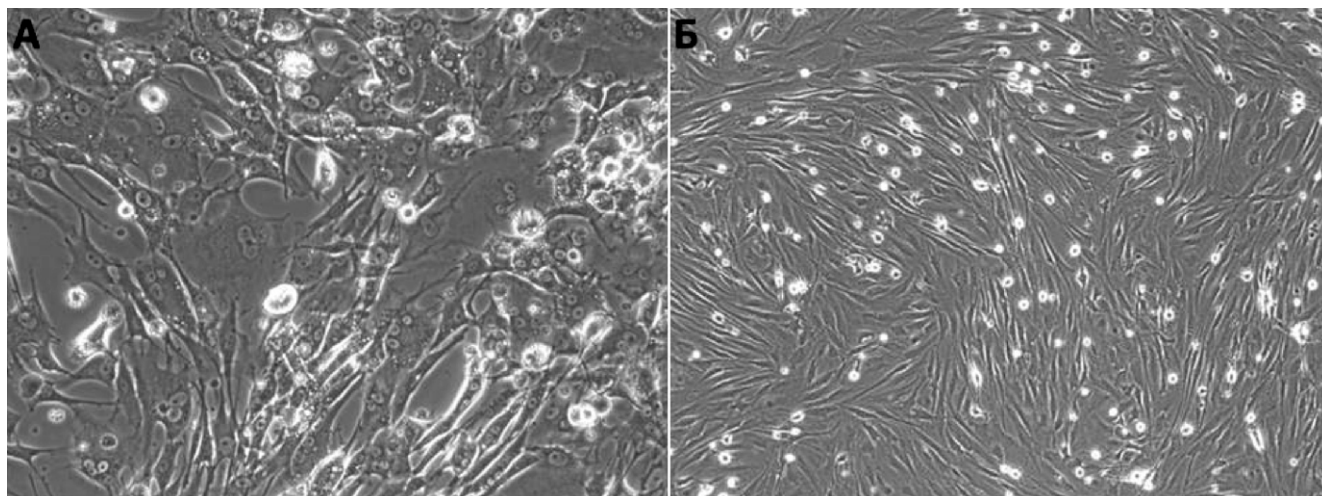


Рис. 1. Культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани. А – пассаж 1, прикрепление клеток к субстрату и активная миграция из ферментированной ткани; Б – пассаж 4, монослойная культура, клетки имеют мезенхимный фенотип. Фазово-контрастная световая микроскопия.

ность принадлежности к различным числовым массивам (или наоборот) определяли с помощью t-теста (Т-ТЕСТ) в пакете статистических исследований Excel 2003. Во всех случаях статистические значения характеризовались нормальным распределением.

Результаты и обсуждение

На сегодняшний день стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) являются уникальным источником мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, сопоставимых с клетками костного мозга, которые можно выделить в результате малоинвазивной операции независимо от возраста и пола животных. Сами клетки представляют собой аутологичную быстро пролиферирующую гомогенную фракцию и спо-

собны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях. Наши результаты показали, что первичная культура клеток содержала крупные стромальные клетки и адипоциты, несущие жировые капли (рис. 1, А). После пересевов к четвертому passages культура состояла из быстро размножающихся прогениторных клеток, которые имели морфологию мезенхимных клеток — соотношение ядра к цитоплазме около 1, тело клетки фибробластоподобное (рис. 1, Б).

Изменения иммунофенотипического профиля культуры СКЖТ от первого до четвертого пассажа приведены в табл. 1. Значительные изменения в экспрессии поверхностных маркеров отмечены жирным шрифтом и демонстрируют принадлежность культуры четвертого пассажа к мультипотентным мезенхимным

Таблица 1

Иммунофенотипический анализ культур СКЖТ 1-го и 4-го пассажей

Анализируемые маркеры	Уровень экспрессии		Клетки-мишени, экспрессирующие данный маркер
	Пассаж 1	Пассаж 4	
Isotype IgG	0,109%	0,523%	Автофлуоресценция
CD11b-	0,215%	5,743%	Лейкоциты
CD14-	0,640%	2,439%	Моноциты
CD19-	2,310%	5,702%	В-лимфоциты
CD34-	5,529%	4,384%	Эндотелиальные клетки
CD45-	0,022%	0,111%	Лейкоциты
CD133-	0,013%	0,354%	Эндотелиальные клетки
CD29+	99,775%	95,330%	ММСК
CD90+	29,719%	98,907%	ММСК
CD105+	87,763%	93,423%	ММСК

Значения статистических показателей, характеризующих вес долей площадей (%) трех типов тканевых структур: незрелая ретикулофиброзная костная ткань, зрелая (пластинчатая) костная ткань и соединительная ткань

Группы эксперимента	Сроки экспериментальных наблюдений (сутки)			
	21	60	120	180
Основная группа				
Незрелая ретикулофиброзная костная ткань	50,2 ± 7,1	58,1 ± 2,9	55,1 ± 3,8	23,1 ± 10,2
Зрелая (пластинчатая) костная ткань	27,3 ± 6,3	23,7 ± 8,5	48,2 ± 5,1	41,4 ± 13,6
Соединительная ткань	28,3 ± 7,8	19,3 ± 5,1	2,5 ± 2,1	2,5 ± 2,1
Группа сравнения				
Незрелая ретикулофиброзная костная ткань	40,2 ± 4,9	1,4 ± 1,3	0,1 ± 0,3	1,8 ± 2,7
Зрелая (пластинчатая) костная ткань	38,3 ± 6,3	34,6 ± 7,3	49,9 ± 8,1	39,9 ± 7,3
Соединительная ткань	35,7 ± 7,8	55,2 ± 4,1	55,1 ± 6,2	62,7 ± 16,1

стромальным клеткам (ММСК), а именно — положительная экспрессия маркеров CD105+/CD90+/CD29+. Таким образом, культура, которую использовали для дальнейших исследований, обладала всеми свойствами культуры ММСК: клетки были адгезивны к пластику, обладали способностью формировать быстро пролиферирующие плотные колонии, экспрессировали характерные поверхностные маркеры: CD105+/CD90+/CD29+, и не экспрессировали маркеры клеток гемопоэтического ряда: CD45-/CD11b-/CD34-.

По результатам гистоморфометрического исследования анализ динамики изменения показателей долей площади, занимаемой фиброретикулярной костной тканью, зрелой пластинчатой костной тканью и фиброзной (клеточно-волоконистой) соединительной тканью, показал, что в пространстве между аутотрансплантатом и материнской костью (нижняя челюсть) и в них самих развиваются процессы, которые с высокой степенью достоверности можно рассматривать как эффект воздействия СКЖТ (статистические показатели по всем группам наблюдений представлены в табл. 2).

Так, на ранних сроках эксперимента (21-е и 60-е сут.) в указанной области наблюдали интенсивное формирование фиброретикулярной костной ткани (рис. 2, 3; табл. 2). При этом активный остеогенез протекал как в основной группе, так и в группе сравнения. Однако в основной группе опыта площадь, занимаемая фиброретикулярной костной тканью, была статистически значимо больше, чем в группе сравнения ($t \leq 0,001$) (рис. 2). Относительно высокая интенсивность костеобразования, отмеченная у животных группы сравнения на 21-е сут. была обусловлена непосредственной и естественной регенераторной реакцией костной ткани на травматическое воздействие. При этом она была значительно менее выраженной, чем у животных основной группы. В основной группе, начиная с 21-х сут., наблюдали стабильно высокие значения этого показателя, которые сохранялись вплоть до 120-х сут. опыта (рис. 3, А).

Однако к 180-м сут. площади, занятые незрелыми костными структурами фиброретикулярного типа, резко сокращались ($t \leq 0,001$) (рис. 2). При этом костная ткань аутотрансплантата, прежде гиперплазированная под влиянием активных СКЖТ, к 180 сут. подвергалась частичной, иногда очень выраженной резорбции (рис. 3, Б), в ней нарастал удельный вес полей фиброзной и клеточно-волоконистой соединительной ткани ($t \leq 0,001$).

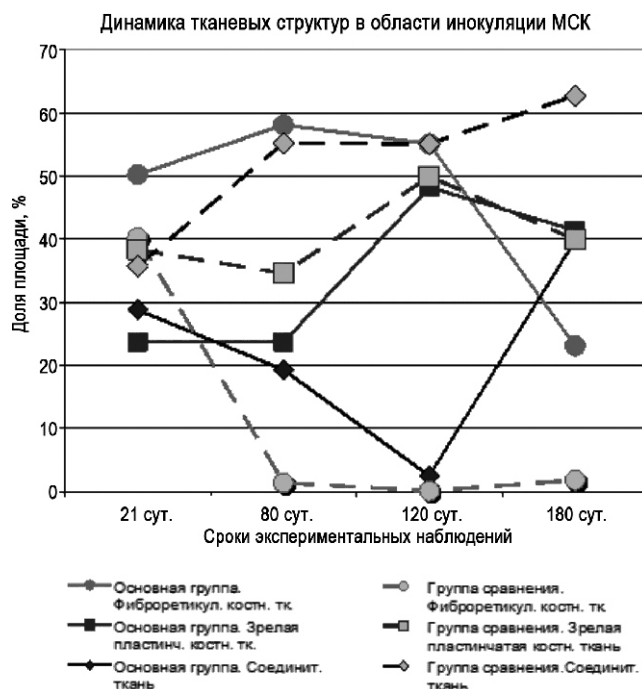


Рис. 2. Статистические показатели, отражающие динамику изменения площади 3 типов тканевых структур: фиброретикулярной костной ткани, зрелой пластинчатой костной ткани, соединительной ткани.

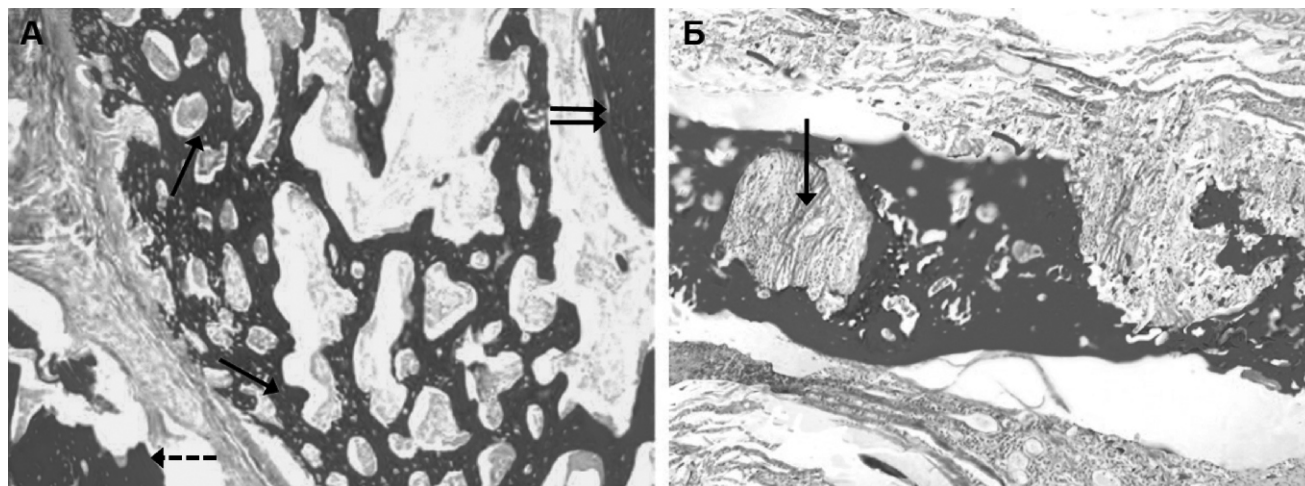


Рис. 3. А — основная группа, 21 сут. наблюдений. Интенсивное новообразование фиброретикулярной костной ткани (сплошные одиночные стрелки) в пространстве между костным аутотрансплантатом (пунктирная стрелка) и материнской костью (сдвоенные стрелки). Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение $\times 2,5$. Б — основная группа, 180 сут. наблюдений. Выраженные проявления резорбции в прежде гиперплазированной костной ткани, располагавшейся в пространстве между аутокостным трансплантатом и материнской костью. В обширных резорбционных полостях располагается фиброзная соединительная ткань (стрелка). Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение $\times 50$.

Что касается зрелой пластинчатой кости, имеющей остеонное строение, то в сроки 120 сут. и 180 сут. ее показатели значимо нарастают относительно 60 сут. ($t \leq 0,001$).

В группе сравнения на всех сроках наблюдения между костным аутотрансплантатом и материнской костью располагалась широкая зона фиброзной соединительной ткани (рис. 4).

Таким образом, судя по динамике изменения долей площадей, занимаемых тремя различными типами тканевых структур в пространстве между аутотрансплантатом и материнской костью, куда в основной группе экспериментов инокулировали аутологичные стромальные клетки, полученные из жировой ткани (СКЖТ), происходила индукция образования нового костного вещества, особенно выраженная в сроки 21-е — 60-е сут. Об этом, в частности, свидетельствует статистически значимое превышение интенсивности новообразования костного вещества в основной группе относительно этого показателя в группе сравнения. Интенсивность костеобразования в группе сравнения была относительно высокой лишь на 21-е сут., что можно объяснить непосредственной и естественной репарационной реакцией собственных остеогенетических элементов костной ткани. И, тем не менее, в основной группе показатели остеогенетической активности на 21-е сут. были значимо выше, чем в группе сравнения (табл. 2, рис. 2).

В целом, в области инокуляции СКЖТ происходили сложные взаимосвязанные процессы, отражающие как остеогенетический потенциал инокулированных клеток, так и особенности их характеристик, в частности, очевидную гетерогенность этой клеточ-

ной популяции по продолжительности жизни. Это в значительной мере соответствует концепции Хейфлика—Мурхеда, которые постулировали гетерогенность популяций стволовых клеток, связанную с нарастанием числа дефектных репликаций, сопровождающихся одновременно сокращением на концах хромосом длины теломер, чем обусловлены процессы старения, в том числе стволовых клеток [6].

Можно предположить, что пул СКЖТ в отдаленные сроки (после 120 сут.) при отсутствии его пополнения извне истощался в результате созревания определенной части этих клеток (здесь и далее см.

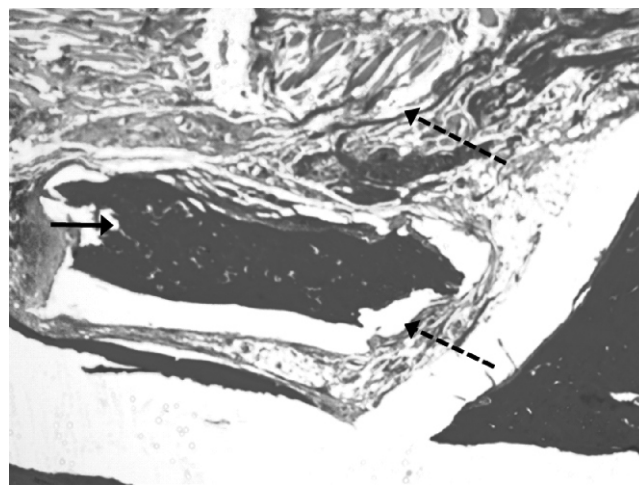


Рис. 4. Группа сравнения, 60 сут. опыта. Костный аутотрансплантат, имеющий изъеденные края (сплошная стрелка), окружен широкой зоной фиброзной соединительной ткани (пунктирные стрелки). Признаки остеогенеза отсутствуют. Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение $\times 2,5$.

рис. 2). О правильности такой гипотезы свидетельствовало также значимое возрастание к 120 и 180 сут., по сравнению с 60 сутками, доли зрелой пластинчатой кости ($t \leq 0,001$). Можно предположить, что в процессе ремоделирования происходило истощение пула введенных в пространство между материнской костью и аутоотрансплантатом СКЖТ и прекращение после 120-х сут. (к 180-м сут.) эффекта индукции остеогенеза, вызванной введенными клетками. В литературе описываются и обсуждаются отдельные звенья механизмов, регулирующих процесс ограничения числа клеточных делений за счет укорочения теломер [7]. Это явление связывают с отсутствием теломеразной активности на концах хромосом теломерах, в результате чего часть клеток по мере осуществления митозов выпадает из циклов репликации ДНК [7]. Такие же эффекты можно наблюдать в митохондриальных ДНК, что обуславливает активацию механизмов апоптоза в клетках [8].

Заслуживает внимания динамика изменения показателей долей площадей, занимаемых в группах наблюдений соединительной тканью. На рис. 2 видно резкое возрастание удельного веса площадей, занятых соединительной тканью в основной группе на 180-е сут опыта. Такая динамика отражает процессы резорбции костного вещества с замещением его соединительной тканью, что наблюдалось на значительных по протяженности участках аутоотрансплантата на сроке 180-е сут. ($t \leq 0,001$). На гистологических препаратах этому процессу соответствовали выраженные картины деградации костного вещества, что выражалось образованием обширных резорбционных дефектов в костных блоках (рис. 3, Б).

В основной группе, где в область экспериментального воздействия вводили СКЖТ, до 120-х сут. опыта площади, занимаемые соединительной тканью, были минимальными, и, напротив, в группе сравнения, где клетки не вводили, наблюдали значительно большие доли площади, занимаемой фиброзной либо клеточно-волокнистой тканью (рис. 2, 4).

Такое преобладание соединительнотканых структур объясняется, вероятно, дефицитом трофического обеспечения, обусловленном конкурентностью между тканевыми структурами с разным уровнем специализации [9]. Так, в группе сравнения наблюдали неровность краев костного аутоотрансплантата, а также дегенерацию и декомпозицию пристеночно расположенных клеток и снижение их числа (рис. 4). Эти изменения свидетельствуют о том, что использованная экспериментальная модель по условиям трофического обеспечения аутоотрансплантата не являлась оптимальной, что и привело к возникновению описанных структурных проявлений альтерации в костном аутоотрансплантате как в группе сравнения, так и при пре-

кращении индуцирующего остеогенез воздействия активных СКЖТ при истощении их пула в основной группе к 180-м сут. опыта.

Заключение

Таким образом, можно заключить, что одним из клинически важных эффектов введения СКЖТ являлось заполнение пространства между костным аутоотрансплантатом и материнской костью новообразованной костной тканью, которая закономерно претерпевает вторичную перестройку и дифференцировку в процессе ремоделирования. В эти физиологические процессы вовлекаются и СКЖТ, введенные в пространство между материнской костью и аутоотрансплантатом.

Интенсивность образования костного вещества *de novo* (фибро-ретикулярная кость), его значимое возрастание по сравнению со второй экспериментальной группой полностью отражает остеогенетический потенциал инокулированных клеток.

Вместе с тем, после 120-х сут. (к 180-м сут.) наблюдали значимое снижение площади, занимаемой фиброретикулярной костной тканью при одновременном значительном возрастании площади зрелой пластинчатой костной ткани (рис. 3). Этот феномен, на наш взгляд, можно объяснить снижением числа активных клеток в популяции инокулированных СКЖТ, которая не пополялась из-за ограниченного числа делений клеток, в результате чего происходило постепенное истощение популяции активных остеогенных предшественников.

Интерпретация полученных нами данных совпадает с концепцией Hayflick, Moorhead (1961) и Heidinger с соавторами (2012), находящая сегодня все большее число сторонников [7, 10]. Эта концепция постулирует существование механизма, ограничивающего число делений клеток из-за отсутствия активной теломеразы. Указанный механизм играет важную роль в стабилизации процесса смены клеточных генераций, обуславливает «старение» клеточных популяций, а также препятствует иммортализации клеток и, соответственно, появлению злокачественных новообразований.

Список литературы

1. Ohgushi H., Goldberg V.M., Caplan A.I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 1989; 7(4): 568-78.
2. Bunnell B.A., Flaate M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; V. 45: 115-20.
3. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies. *Tissue Eng*. 2001; V. 7: 211-26.

4. Dubois S.G., Floyd E.Z., Zvonic S., Kilroy G., Wu X., Carling S., Halvorsen Y.D., Ravussin E., Gimble J.M. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimen. *Methods Mol. Biol.* 2008; V. 449:69-79.

5. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. М.: Медицина; 2002.

6. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25(3):585-621.

7. Signer R.A.J., Morrison S.J. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(2): 152-65.

8. Seruya M., Shah A., Pedrotty D., du Laney T., Melgiri R., McKee J.A., Young H.E., Niklason L.E. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant.* 2004; 13(2):93-101.

9. Sethe S., Scutt A., Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing research reviews.* 2006; 5(1): 91-116.

10. Heidinger B.J., Blount J.D., Boner W., Griffiths K., Metcalfe N.B., Monaghan P. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; V. 109:1743-8.

Поступила 05.05.15.

References

1. Ohgushi H., Goldberg V.M., Caplan A.I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *Journal of Orthopaedic Research.* 1989; 7(4): 568-78.

2. Bunnell B.A., Flaat M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008; V. 45: 115-20.

3. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J.I., Futrell W.J., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies. *Tissue Eng.* 2001; V. 7: 211-26.

4. Dubois S.G., Floyd E.Z., Zvonic S., Kilroy G., Wu X., Carling S., Halvorsen Y.D., Ravussin E., Gimble J.M. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods Mol. Biol.* 2008; V. 449: 69-79.

5. Avtandilov G.G. Basics of quantitative pathological anatomy. Moscow; Medicina, 2002. (in Russian)

6. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25(3): 585-621.

7. Signer R.A.J., Morrison S.J. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(2): 152-65.

8. Seruya M., Shah A., Pedrotty D., du Laney T., Melgiri R., McKee J.A., Young H.E., Niklason L.E. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant.* 2004;13(2): 93-101.

9. Sethe S., Scutt A., Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing research reviews.* 2006; 5(1): 91-116.

10. Heidinger B.J., Blount J.D., Boner W., Griffiths K., Metcalfe N.B., Monaghan P. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; V. 109: 1743-8.

Received 05.05.15

Сведения об авторах:

Орлов Андрей Алексеевич, д.м.н., гл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Сабурова Ирина Николаевна, д.биол.н., зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»; проф. каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

Зурина Ирина Михайловна, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Сысоев Сергей Дмитриевич, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»