

30. Watt F.M. Women in cell biology: how personal lives shape careers. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2006, v. 7, №5, p. 378–380.
31. Watt F.M. and Phil D. Involucrin and other markers of terminal differentiation. *J. Invest. Derm.*, 1983, v. 81, p. 100–103.

Поступила в редакцию 17.09.10

AGE-RELATED CHANGES OF THE EPIDERMIS OF MEN'S SCALP

V.I. Nozdrin, M.V. Gorelova and T.A. Belousova

Histological, morphometric and immunocytochemical methods were used to study the autopsy samples of the interfollicular epidermis in the temporal region of scalp of male individuals aged from 7 months to 75 years. Monoclonal antibodies against Ki-67, involucrin and p53 were applied to evaluate the proliferative pool in the epidermis, the thickness of the layer of the cells

which started the terminal differentiation, and the fraction of the apoptotic cells. Epidermis in children was thin; it had a low content of Ki-67- and p53-positive cells and small thickness of involucrin-positive cell layer. The highest proliferative activity and maximal thickness of the epidermis were detected at the age of 19–21 years. Thereafter the epidermis thinning was observed, together with the progressive decrease of keratinocyte proliferative activity and an increase of the fraction of p53-positive cells. Absolute thickness of the involucrin-positive cellular layer remained practically constant at different ages, while its proportion in the total epidermal thickness increased.

Key words: *skin, scalp, interfollicular epidermis, proliferation, aging*

Scientific Department, «Retinoids» Pharmaceutical Joint-Stock Company, Moscow; Department of Histology, Cytology and Embryology, Medical Institute of Oryol State University

© Коллектив авторов, 2011
УДК 616.71-001.5-089.843:599.323.4

Л.Б. Буравкова¹, М.П. Валушкина¹, Е.Р. Андреева¹ и В.И. Логинов²

РЕПАРАТИВНЫЙ ОСТЕОГЕНЕЗ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРИ РАЗЛИЧНОМ СОДЕРЖАНИИ КИСЛОРОДА

¹ Группа клеточной физиологии (руков. — проф. Л.Б. Буравкова), ² лаборатория морфологии (зав. — А.С. Капланский), Государственный научный центр РФ, Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Проведен сравнительный гистологический и морфометрический анализ костной мозоли (КМ) через 14 и 30 сут у крыс, которым сразу после экспериментального перелома малоберцовой кости в область перелома вводили клеточные препараты мультипотентных стромальных клеток костного мозга (МСККМ), называемых также мезенхимальными стромальными клетками. Культивирование МСККМ *in vitro* было проведено в условиях нормоксии (20% O₂) и пониженного содержания кислорода (5% O₂). Через 14 сут у крыс без МСККМ (контроль) и с МСККМ вновь образованная КМ состояла из фиброзной, хрящевой и грубоволокнистой костной тканей (ГВКТ). Доля КМ, занятая ГВКТ у крыс, которым вводили МСККМ (5% O₂), была значительно больше, чем в других экспериментальных группах. Коэффициент утолщения КМ через 14 сут восстановления был в 1,3–1,4 раза больше у животных с МСККМ (5% O₂) и МСККМ (20% O₂, P<0,05), чем у крыс без МСККМ. Через 30 сут у крыс с МСККМ КМ была более зрелой с гистологической точки зрения, а восстановление исходной толщины кости было более эффективным. Продemonстрировано улучшение формирования костно-хрящевого фрагмента и образования КМ после введения в область перелома кости у крыс аллогенных МСККМ, предварительное культивирование которых проведено *in vitro* при различном содержании кислорода.

Ключевые слова: *кость, регенерация, мультипотентные стромальные клетки костного мозга, гипоксия*

Мультипотентные стромальные клетки костного мозга (МСККМ), называемые также мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, с высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом могут быть выделены из костного мозга взрослого организма и культивированы *in vitro* до получения необходимой клеточной массы. Развитие клеточных технологий в регенеративной медицине обусловило

интерес к МСККМ в связи с перспективой их использования для улучшения процесса заживления при лечении переломов и повреждений больших участков костей, что было продемонстрировано в ряде исследований, в том числе и в нашей лаборатории [2, 3, 5–7].

Ранее было показано, что при понижении содержания O₂ до 5% в среде культивирования увеличивается пролиферативная активность

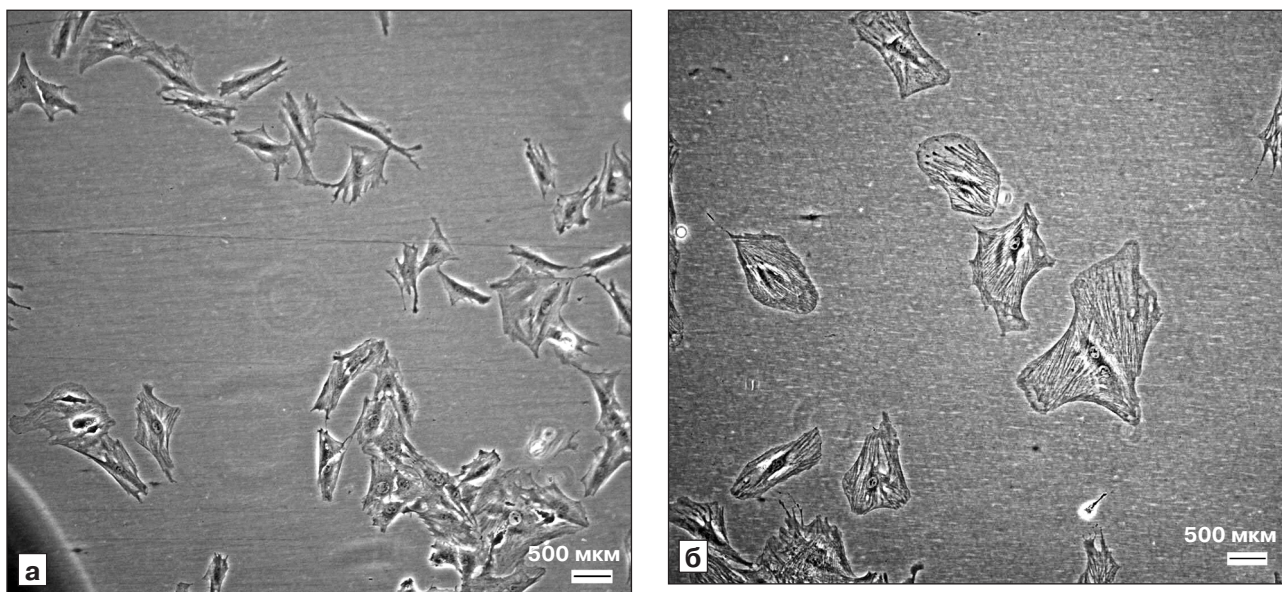


Рис. 1. Мультипотентные стромальные клетки костного мозга (МСККМ) крысы, культивированные при разном содержании кислорода.

а — клетки, культивированные при 5% O_2 , 5% CO_2 , 75% N_2 . Большая часть клеток имеют типичную для МСККМ веретеновидную форму; б — клетки, культивированные при 20% O_2 , 5% CO_2 , 80% N_2 . Преобладают сильно распластанные клетки неправильной формы. Фазовый контраст.

МСККМ из костного мозга крыс и повышается их устойчивость к различным повреждающим факторам [1]. Через 14 сут после введения таких (5% O_2) и нормоксических (20% O_2) МСККМ в область экспериментального перелома малоберцовой кости крыс было обнаружено значимое по сравнению с контролем увеличение объема новообразованных тканей [2].

Цель настоящей работы — исследование формирования костной мозоли (КМ) у крыс после экспериментального перелома малоберцовой кости в разные сроки заживления при введении в область перелома МСККМ, предварительное культивировании которых было проведено при различном содержании O_2 .

Материал и методы. МСККМ из костного мозга крыс выделяли и культивировали как описано ранее при 20% O_2 (N-МСККМ) и 5% O_2 (Нур-МСККМ) [1]. Для анализа прироста клеток в культуре использовали метод видеомикроскопии [2]. Иммунофенотипирование МСККМ на 2-м пассаже проводили с помощью антител к: CD45, CD44, CD54, CD73, CD90 (BD Bioscience, США), жизнеспособность клеток оценивали с помощью набора AnnexinV-FITC Kit (Immunotech, Франция) на проточном цитофлюориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). Клеточные препараты готовили как было описано ранее [2]. Оперативный перелом малоберцовой кости в средней трети проводили в стерильных условиях у наркотизированных животных как было описано ранее [2, 4]. Наркотизацию животных осуществляли путём введения в левую икроножную мышцу 0,1% атропина и золи-тил-100 в дозе 8 мг/кг.

64 самца крыс линии Вистар по 32 животных для 1-го этапа (14 сут) и 2-го этапа (30 сут) (массой около 250 г) были разделены на 4 группы: 1-я — контрольная, пере-

лом без каких-либо дополнительных воздействий (группа П), 2-я — перелом+введение в зону повреждения 0,25 мл культуральной среды (группа П+С), 3-я — перелом+0,25 мл среды + $5 \cdot 10^5$ N-МСККМ (группа П+N-МСККМ), 4-я — перелом+0,25 мл среды + $5 \cdot 10^5$ Нур-МСККМ (группа П+Нур-МСККМ). Разрешение на проведение эксперимента получено от Комиссии ГНЦ РФ — ИМБП РАН по медицинской биоэтике физиологической секции Российского национального комитета по биоэтике.

Через 14 и 30 сут после оперативного вмешательства крыс декапитировали, выделяли оперированную кость, фиксировали в 4% параформальдегиде на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0–7,2) с 2,5% сахарозы, при 4 °С. Декальцинацию в 10% этилендиаминтетрауксусной кислоте (ЭДТА) (pH 7,0–7,2) проводили в течение 10 сут. Затем препараты обезжировали, заливали в гистопласт, изготовляли срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилином–эозином, толуидиновым синим, пикрофуксином и морфометрировали каждый 5-й срез при помощи программы «SigmaScanPro». Через 14 сут на срезах определяли площадь, занимаемую КМ, грубоволокнистой костной тканью (ГВКТ), хрящевой тканью. Коэффициент утолщения (КУ) КМ определяли как отношение диаметров КМ и костных отломков. Через 30 сут определяли КУ КМ. Для оценки эффективности восстановительного процесса использовали расчётный показатель: $KU_{30/14} = KU_{30 \text{ сут}} / KU_{14 \text{ сут}}$. Статистический анализ проводили, используя пакеты программ «Statistica 6.0» и «Microsoft® Excel 2000». Значимость различий оценивали с помощью критерия Манна–Уитни.

Результаты исследования. Культивирование при 5% O_2 приводило к увеличению пролиферативной активности МСККМ по сравнению с таковой при 20% O_2 . На 2-м пассаже коэффициент прироста Нур-МСККМ составлял $3,80 \pm 0,14$, N-МСККМ₂ — $2,7 \pm 0,3$ ($P < 0,05$).

Культивируемые N-МСККМ и Нур-МСККМ различались морфологически: в культурах N-МСККМ на 1-м пассаже преобладали сильно распластанные клетки, а среди Нур-МСККМ было больше мелких вытянутых клеток (рис. 1). Иммунофенотип и жизнеспособность N-МСККМ и Нур-МСККМ в сравниваемых культурах не различались.

Через 14 сут у крыс всех групп сформировалась веретенообразная КМ, скрепляющая проксимальные и дистальные отломки кости. Гистологическое исследование (рис. 2) показало, что КМ покрыта толстой, богатой фибробластами надкостницей. Внутри КМ обнаруживались дистальные и/или проксимальные отломки малоберцовой кости. Новообразованная кость располагалась проксимально и дистально относительно хряща. Поверхность трабекул покрывали остеобласты, пространство между которыми было заполнено соединительной тканью, с кровеносными сосудами различного диаметра. Таким образом, КМ во всех исследованных группах имела сходное строение и состав тканей, однако соотношение площадей на срезе, занятых определённым видом ткани, в сравниваемых группах различалось. В группе П (см. рис. 2, а) КМ покрывала надкостница, от которой отходили тяжи фиброзной ткани к центральной части мозоли. Хрящевая

ткань в среднем занимала 20% КМ. ГВКТ занимала 51,2% КМ. В группе П+С (см. рис. 2, б) зона хрящевой ткани занимала, в среднем, 17%, а ГВКТ — 48,3% КМ. В группе П+N-МСККМ (см. рис. 2, в) хрящевая ткань и ГВКТ составляли 24,2 и 48,4% от площади среза КМ соответственно. В группе П+Нур-МСККМ (см. рис. 2, г) хрящ занимал 16,4%, а ГВКТ — 61,9% КМ. Доля ГВКТ была значимо больше в этой группе животных, чем в группах П+С и N-МСККМ.

Через 30 сут в каждой группе у части животных были отмечены полное восстановление пластинчатой костной ткани и реканализация, что свидетельствовало о завершении регенерации кости. У некоторых крыс отмечена задержка репаративного процесса. Образовавшиеся КМ были твёрдыми на ощупь, но в ряде случаев непрочными, что приводило к нарушению целостности КМ при выделении. В группе П (см. рис. 2, д) у некоторых животных можно было видеть полное восстановление кости с завершённым процессом реканализации и восстановлением пластинчатой костной ткани. У других крыс были выявлены более ранние этапы регенерации, при которых отмечалось большое количество ГВКТ, наличие крупных очагов хрящевой ткани в зоне периостальной мозоли. Кроме этого, наблюдалась и более обычная гистологическая картина для

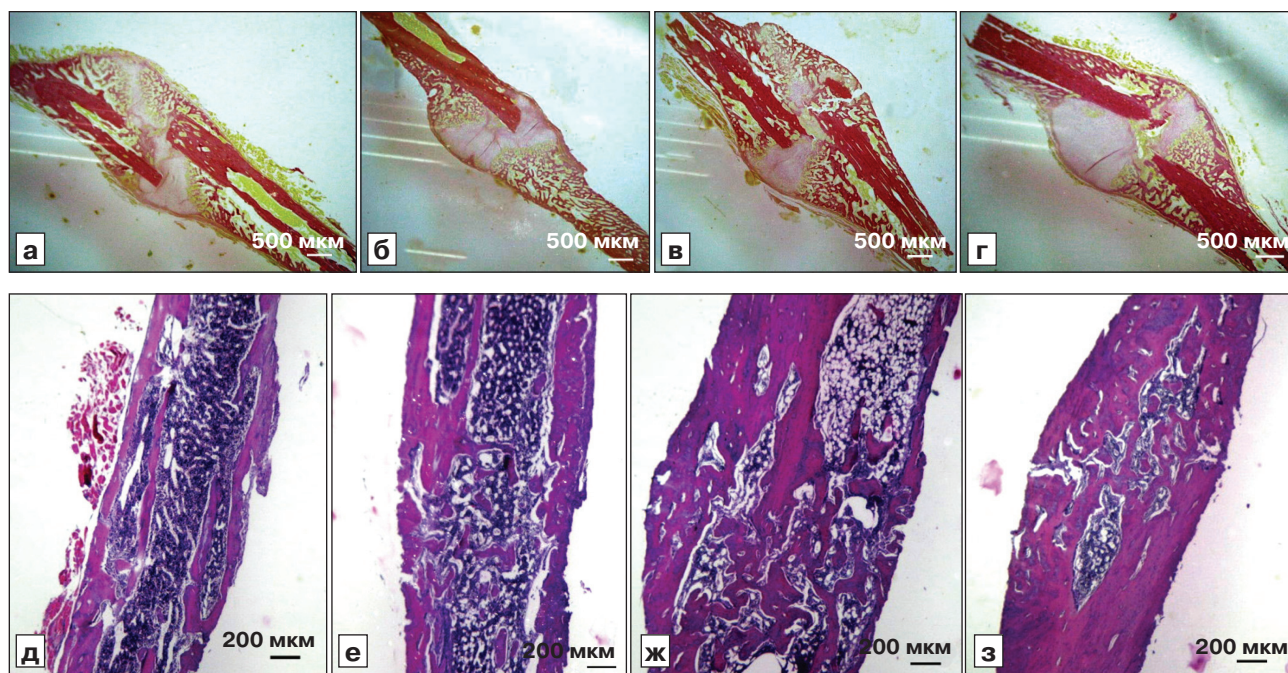


Рис. 2. Репаративный остеогенез на 14-е (а–г) и 30-е (д–з) сутки после экспериментального перелома малоберцовой кости крыс.

а, д — группа П (операционный перелом без дополнительных воздействий); б, е — группа П+С (после перелома в зону повреждения вводили 0,25 мл культуральной среды); в, ж — группа П+N-МСККМ (вводили 0,25 мл среды, содержащей $5 \cdot 10^5$ мультипотентных стромальных клеток костного мозга — МСККМ, культивированных в стандартных условиях); г, з — группа П+Нур-МСККМ (вводили 0,25 мл среды, содержащей $5 \cdot 10^5$ МСККМ, культивированных в условиях гипоксии). Окраска пикрофуксином.

этого срока регенерации: ГВКТ умеренно развитая, хрящевая ткань в виде отдельных небольших островков внутри костных трабекул, начиналось формирование костномозгового канала. В группе П+С (см. рис. 2, е) также выявлялись индивидуальные отличия, но они были не столь значительны как в группе П. В области заживления у крыс в этой группе была умеренно развита ГВКТ, а в половине случаев был отмечен начальный этап реканализации кости. В группе П+N-МСККМ (см. рис. 2, ж) также была умеренно развита ГВКТ, в половине случаев наблюдался начальный этап реканализации. В трабекулах ГВКТ встречались группы клеток хрящевой ткани с окружающим их метакхроматически окрашенным хрящевым матриксом. В группе П+Нур-МСККМ (см. рис. 2, з) степень зрелости КМ значительно варьировала. В большинстве случаев в трабекулах ГВКТ встречались группы хрящевых клеток с окружающим их матриксом. Трабекулы были покрыты слоем активных остеобластов. Межтрабекулярное пространство занимала соединительная ткань, в которой располагались сосуды различного диаметра.

КУ КМ через 14 сут после перелома в группах П+N-МСККМ и П+Нур-МСККМ был значимо больше КУ в контрольных группах П и П+С. Через 30 сут репарации КУ в экспериментальных

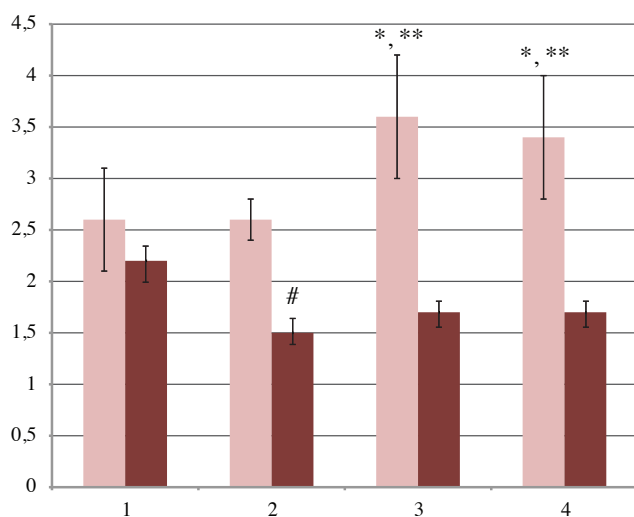


Рис. 3. Коэффициент утолщения костной мозоли через 14 (светлые столбики) и 30 сут (темные столбики) после экспериментального перелома малоберцовой кости крыс.

По горизонтальной оси: 1 — группа П; 2 — группа П+С; 3 — группа П+N-МСККМ; 4 — группа П+Нур-МСККМ; по оси ординат — коэффициент утолщения костной мозоли (отн. ед.). Различия значимы: * по сравнению с показателями в группе П первой серии экспериментов; ** в группе П+С первой серии экспериментов; # в группе П второй серии экспериментов. Расшифровку обозначений групп см. в подписи к рис. 2. Вертикальные отрезки — стандартное отклонение.

группах был меньше, чем в группе П (рис. 3). Соотношение КУ на 30-е и 14-е сутки может служить критерием эффективности восстановительного процесса: чем ближе это соотношение к 1, тем хуже прошло восстановление исходного размера кости. В группе П+N-МСККМ он составлял 0,47, в группе П+Нур-МСККМ — 0,5, в группе П+С — 0,57, в группе П — 0,85

Обсуждение полученных данных. Успешное использование ауто- и аллогенных МСККМ для регенерации было показано при сердечно-сосудистых заболеваниях [12], восстановлении хряща [9], диафиза бедра [13] не только на экспериментальных животных, но при регенерации суставного хряща у человека [14].

В настоящем исследовании была выбрана описанная ранее модель перелома малоберцовой кости [2, 4], которая позволяет моделировать наиболее близкие к реальным условиям повреждения трубчатой кости. Ранее был отмечен положительный эффект от введения клеток в зону перелома, который выражался в увеличении объема КМ, хрящевой ткани, КУ [2]. В данной работе мы продемонстрировали, что после введения гипоксических МСККМ через 14 сут восстановления доля КМ, занятая ГВКТ, была больше, чем при нормоксических МСККМ, а хрящом — меньше. Поскольку формирование ГВКТ характерно для более поздней стадии заживления, можно предположить, что при введении Нур-МСККМ регенерация была более успешной. Через 30 сут после перелома у крыс всех групп образованные КМ имели сходное строение и состав тканей.

Эффективность восстановления исходной толщины трубчатой кости в зоне перелома, что является существенным параметром репаративного процесса, была наиболее значима в группах П+N-МСККМ и П+Нур-МСККМ и минимальна — в группе П, что также подтвердило целесообразность применения МСККМ.

В литературе описаны и другие положительные эффекты от введения стволовых клеток в область перелома: улучшение кровоснабжения [5] и усиление репаративного остеогенеза [3, 6]. При однократном введении клеток наиболее значимые результаты проявлялись на ранних этапах заживления [2, 3].

Преимущества введения именно Нур-МСККМ в зону повреждения были продемонстрированы и другими исследователями [8, 10]. Эффективность использования Нур-МСККМ объяснялась, в первую очередь, паракринным влиянием на такие параметры, как пролиферативная активность [10], хондрогенная и остеогенная дифференцировка [11]. В нашей работе мы оценивали параметры

заживления самой кости. Гистоморфометрический анализ выявил большую долю ГВКТ в КМ в группе П+Нур-МСКМ, чем в группе П+N-МСКМ, что можно объяснить увеличением доли остеогенных, малодифференцированных клеток при культивировании в условиях гипоксии.

Таким образом, проведенное нами исследование показало эффективность введения суспензии аллогенных МСКМ из костного мозга, предварительное культивирование которых проведено *in vitro*, для улучшения формирования КМ при экспериментальном переломе малоберцовой кости у крыс. Значительных различий между Нур-МСКМ и N-МСКМ по степени воздействия на процесс регенерации не обнаружено. Однако, учитывая свойства Нур-МСКМ (высокая пролиферативная активность и низкая степень коммитированности), можно говорить о том, что эти клетки являются более предпочтительными для применения в регенеративной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

- Буравкова Л.Б. и Анохина Е.Б. Влияние гипоксии на стромальные клетки-предшественники из костного мозга крыс на ранних этапах культивирования. Бюл. exper. биол., 2007, т. 143, № 4, с. 386–389.
- Буравкова Л.Б., Капланский А.С., Андреева Е.Р. и др. Особенности формирования костной мозоли у крыс после введения в область перелома мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, культивируемых при различном содержании кислорода. Клет. трансп. ткан. инж., 2009, т. 4, № 3, с. 52–57.
- Деев Р.В., Цупкина Н.В., Николаенко Н.С. и др. Результаты трансплантации культуры аутогенных стромальных клеток костного мозга в область краевого дефекта длинных трубчатых костей. Травматол. ортопед. России, 2007, т. 2, № 44, с. 57–63.
- Дурнова Г.И., Логинов В.И. и Капланский А.С. Заживление перелома малоберцовой кости у крыс при длительном выживании. Авиакосм. эколог. мед., 2002, т. 36, № 3, с. 52–55.
- Кругляков П.В., Соколова И.Б., Зинькова Н.Н. и др. Влияние сингенных мезенхимных стволовых клеток на восстановление костной ткани у крыс при имплантации деминерализованного костного матрикса. Цитология, 2005, т. 57, № 6, с. 466–477.
- Фатхутдинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Пулин А.А. и др. Особенности репаративного остеогенеза при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Бюл. exper. биол., 2005, т. 140, № 7, с. 109–113.
- Caplan A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J. Cell. Physiol., 2007, v. 213, p. 341–347.
- Hu X., Yu S.P., Fraser J.L. et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 2008, v. 135, № 4, p. 799–808.
- Im G.II., Kim D.Y., Shin J.H. et al. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. J. Bone Joint Surg. Br., 2001, v. 83-B, p. 289–294.
- Lennon D.P., Edmison J.M. and Caplan A.I. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis. J. Cell Physiol., 2001, v. 187, № 3, p. 345–355.
- Malladi P., Xu Y., Chiou M. et al. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2006, v. 290, № 4, p. 1139–1146.
- Psaltis P.J., Zannettino A.C.W., Worthley S.G. and Grothos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. Stem Cells, 2008, v. 26, p. 2201–2210.
- Tsuchida H., Hashimoto J., Crawford E. et al. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. J. Orthop. Res., 2003, v. 2, № 1, p. 44–53.
- Wakitani S., Imoto R., Yamamoto T. et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. Osteoarthritis Cartilage, 2002, v. 10, № 3, p. 199–206.

Поступила в редакцию 17.03.10

Получена после доработки 25.07.10

REPARATIVE OSTEOGENESIS AFTER TRANSPLANTATION OF BONE MARROW MULTIPO- TENT STROMAL CELLS CULTIVATED AT VARIOUS OXYGEN CONCENTRATIONS

*L.B. Buravkova, M.P. Valiushkina, Ye.R. Andreyeva
and V.I. Loginov*

Comparative histological and morphometric methods were used to study the bone callus (BC) in rats 14 and 30 days after the experimental fibula fracture. Animals were infused with cell preparations of multipotent bone marrow stromal cells — BMSC (also known as multipotent mesenchymal stromal cells) in the site of injury immediately after the fracture. BMSC were cultivated *in vitro* under normoxic (20% O₂) and hypoxic (5% O₂) conditions. 14 days after the fracture, in rats that received no BMSC (control group) and in animals injected with BMSC, newly formed BC contained fibrous tissue, cartilage and reticulofibrous bone tissue (RFBT). The portion of BC, occupied by RFBT was significantly greater in rats that received BMSC grown at 5% O₂, than in the other experimental groups. Thickening index of BC at day 14 was 1.3 and 1.4 times higher in animals treated with BMSC grown at 5% and 20% O₂ ($p < 0.05$) than in rats that received no BMSC. At day 30, BC was histologically more mature in rats that received BMSC infusion than in the control group, while the restoration of the initial bone thickness was also more effective in these animals. Thus, the results of this study demonstrated that the infusion of allogeneic BMSC, expanded *in vitro* at different oxygen concentrations, into the site of fracture improved osteocartilaginous fragment and BC formation and bone size restoration in rats with fibula fracture.

Key words: bone, regeneration, bone marrow multipotent stromal cells, hypoxia

Cell Physiology Group and Laboratory of Morphology, Russian Federation State Scientific Center; RAS Institute of Medico-Biological Problems, Moscow