

ОСТЕОГЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОБЛАСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Возианов А. Ф.*, Гринь В. К.**, Климовицкий В. Г.***, Попандопуло А. Г.**, Оксимец В. М.***, Штутин А. А.**

* Институт урологии и нефрологии АМН Украины, Киев

** Институт неотложной и восстановительной хирургии АМН Украины, Донецк

*** Донецкий национальный медицинский университет МОЗ Украины, Донецк

В статье представлены данные экспериментальных и клинических исследований процессов, происходящих в области трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при нарушениях остеорепаративных процессов и дефектах костных тканей. Авторами показано, что фенотип некоммитированных и коммитированных по остеогенному пути МСК и их цитокиновая продукция свидетельствуют о том, что эти клетки могут принимать эффективное участие во взаимосвязи с иммунокомпетентными клетками и активно участвуют в процессах ремоделирования костного матрикса и формировании костной ткани в целом. В работе показано, что процессы остеогенеза, протекающие в области трансплантации МСК, зависят от условий, существующих в костном реципиентном ложе. При сохранении в костной ткани клеточных компонентов формирование новой костной ткани идет по типу прямого остеогенеза с формированием на ранних стадиях грубоволокнистой костной ткани. При гибели клеточных элементов кости в области трансплантации МСК вначале происходят процессы, напоминающие ремоделирование костной ткани с последующим образованием новой молодой костной ткани.

Ключевые слова: некоммитированные и коммитированные по остеогенному пути мезенхимальные стволовые клетки, фенотип и продукция цитокинов мезенхимальными стволовыми клетками, трансплантация мезенхимальных стволовых клеток, остеогенез, ремоделирование костной ткани.

В последние 10—15 лет отмечается значительное увеличение количества научных публикаций, посвященных биологии стволовых клеток (СК) и возможности их использования в клинической практике. Столь пристальный интерес к стволовым клеткам объясняется возможностью создания органосберегающих технологий лечения патологических состояний, в соответствии с принципами регенеративной медицины [9].

Теоретическими предпосылками, определяющими возможность реализации этих принципов, являются следующие положения: 1) любой патологический процесс считается завершенным только после того, как в результате репарации происходит восстановление клеточной структуры поврежденного органа и возобновление его функций, утраченных в период болезни [10]; 2) в негемопоэтических тканях имеются клетки-предшественники, способные к самоподдержанию в течение времени, соизмеримого с жизнью организма, независимые от стволовых кроветворных клеток [11, 21]; 3) согласно теории клеточно-дифференциальной организации тканей, все ткани организма состоят из трех основных групп клеток — СК, клеток-предшественников и зрелых, закончивших дифференцировку, клеток [3, 8, 9]; 4) в процессах регенерации, как физиологической, так и репаративной, ведущее значение играют клеточные источники, к которым относятся СК и клетки-предшественники [3, 4, 8].

Костная ткань, как производная мезенхимы, относится к обновляющейся ткани, дифференциальная организация которой представлена от стволовых до высокодифференцированных клеток. Клеточными источниками репаративной регенерации костной ткани являются малодифференцированные клетки-предшественники, у которых функция пролиферации не блокирована. К ним относятся мезенхимальные стволовые клетки (МСК), локализованные в строме костного мозга и экстраклеточных кроветворных органах, остеогенные клетки внутреннего слоя периоста, клеточные элементы каналов остеонов и эндоста, а также периваскулярные клетки [3, 8].

Изучению остеогенного потенциала культивированных МСК в последнее время уделяется значительное внимание. В большом количестве экспериментальных работ *in vitro* и *in vivo* убедительно показано, что при определенных условиях культивирования МСК начинают формировать межклеточные взаимосвязи, откладывая экстрацеллюлярный матрикс с последующим отложением в нем солей кальция и формированием остеоноподобных структур [36, 43—46, 51]. В ряде работ показана клиническая эффективность МСК в восстановлении остеорепаративных процессов у больных с ложными суставами и асептическими некрозами костной ткани [6, 15, 22, 23, 35].

Одним из важных и весьма интересных как для теории, так и клинической практики, является вопрос о процессах, происходящих в области трансплантации МСК, и механизмах восстановления поврежденной костной ткани. Однако нам не удалось найти данных, которые бы описывали процессы, происходящие в области трансплантации МСК.

Цель работы — на основании накопленного нами в течение последних трех лет исследований экспериментального и клинического материала представить описание остеогенных процессов, происходящих в области трансплантации МСК, на существующем этапе разработки проблемы.

Материалы и методы исследования

Изучение процессов, происходящих в области трансплантации МСК, осуществляли в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и на основе анализа клинических наблюдений.

В экспериментах *in vitro* изучали модификацию рецепторного аппарата и продукцию цитокинов некоммутированными и коммутированными по остеогенному типу МСК и моделировали реципиентное ложе.

Модификацию рецепторного аппарата некоммутированных и коммутированных по остеогенному пути МСК изучали методом иммунофенотипирования клеточных культур. Мембранные поверхностные рецепторы определяли при помощи моноклональных антител (МКА). Использовали МКА против кластеров дифференцирования CD (cluster of designation (differentiation)): CD44 клон L178 a/h Mouse Ig1, k-pur; CD56 клон B159 a/h Mouse Ig1, k-R-PE; CD166 клон 3A6 a/h Mouse Ig1, k-R-PE; CD54 клон LB-2 a/h Mouse Ig2b, k-pur; CD58 клон 1C3 a/h Mouse Ig2a, k-FITC; CD29 клон HUTS-21 a/h Mouse Ig2a, k-R-PE; CD49a клон SR84 a/h Mouse Ig1, k-pur; CD49b клон AK-7 a/h Mouse Ig1, k-pur; CD49c клон C3IL1 a/h Mouse Ig1, k-pur; CD62L клон Dreg-56 a/h Mouse Ig1, k-FITC; HLA-A,B,C клон G46-2.6 a/h Mouse Ig1, k-FITC; HLA-DR клон T 36 a/h; Mouse Ig2b, k-FITC. Вторичные МКА: Rat a/mouse Ig1-R-PE (Rat Ig1, k), Rat a/mouse Ig1-FITC (Rat Ig1, k), Rat a/mouse Ig1-R-PE (Rat Ig1, k), Rat a/mouse IgM-R-PE (Rat Ig2a, k), Mouse a/rat IgM-R-PE (Mouse Ig1, k), Rat a/mouse Ig2a-FITC (Rat Ig1, k), Mouse a/rat Ig2a-FITC (Mouse Ig2b, k), Rat a/mouse Ig2b-FITC (Rat Ig2a, k). Изотип-контроли МКА прямой и первичных МКА непрямої реакции: Mouse Ig2a, k-FITC, Mouse Ig2a, k-R-PE, Mouse Ig2b, k-FITC, Mouse Ig2b, k-R-PE, Mouse Ig, k-FITC, Mouse Ig1, k-R-PE, Mouse Ig1, k-FITC, Rat Ig1, k-FITC, Rat Ig1, k-R-PE, Rat Ig2a, k-FITC, Rat Ig2a, k-R-PE, Rat Ig-pur, Mouse Ig-pur, Mouse IgM-pur, Mouse Ig2a-pur, Rat Ig2a-pur, mouse Ig2b-APC, a/h Mouse Ig2b, k-pur, Rat Ig2a, k-FITC, Mouse Ig1, k-pur. Дополнительные изотип-контроли вторичных антител: Rat Ig1-R-PE, Rat Ig1-FITC, Rat

Ig2a R-PE, Mouse Ig1 R-PE, Mouse Ig2b, k-FITC.

В исследованиях использовали МКА, рекомендованные для специфического маркирования поверхностных антигенов Восьмым Международным рабочим совещанием по вопросам лейкоцитарных антигенов дифференцирования человека (The 8th International HLDA Workshop and Conference, Adelaide, Australia, 2004). Все МКА и изотип-контроли были производства фирмы BD Biosciences (США).

Маркирование некоммутированных и остеоиндуцированных МСК на поверхностные антигены осуществляли в культурах 1—4 пассажей от 14 линий.

Определение концентрации цитокинов в супернатантах культивированных МСК проводили при помощи иммуноферментного метода BD OptEIA™ Human ELISA (BD Biosciences, США), которые предназначены для количественного определения цитокинов человека в сыворотке, плазме и в супернатанте (кондиционированной среде) клеточных культур. Использовали наборы для определения следующих цитокинов: human IL-1 ELISA Kit II; human IL-2 ELISA Kit II; human IL-4 ELISA Kit II; human IL-6 ELISA Kit II; human IL-8 ELISA Kit II; human TNF ELISA Kit II.

Моделирование реципиентного ложа *in vitro* позволило изучить поведение МСК как в клеточном носителе, так и в области контакта с костной тканью. Для изучения процессов, происходящих в толще клеточного носителя, МСК культивировали в многокомпонентном коллагеновом матриксе (МКМ), а в месте контакта с костной тканью — на кортикальном деминерализованном костном матриксе (ДМК). Посевная концентрация МСК в МКМ составляла 1млн. клеток в 10^{-3} л, а на ДМК — 1 млн. клеток на 10^{-4} м². Культивирование продолжали в течение двух недель в CO₂-инкубаторе при одинаковых условиях (37°C; 5% CO₂), после чего материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и окрашивали гематоксилином и эозином.

В статье, опубликованной нами ранее [7], было показано, что одной из причин замедления или нарушения течения процессов остеорепарации при прямом механизме травмы являются морфо-функциональные изменения клеток надкостницы, которые характеризуются потерей ими пролиферативных способностей и нарушением клеточной морфологии, а также гибель значительного количества собственно костных клеток. Поэтому экспериментальные исследования *in vivo* нами проводились на лабораторных животных (15 половозрелых крыс самцов линии Вистар массой 150—200 г), у которых моделировалась тяжелая травма голени, приводящая к нарушению процессов остеорепарации (по описанной нами ранее методике моделирования [7]). На третьи сутки после моделирования высокоэнергетического перелома в межкостную зону инъекционно через кожу осуществлялось введе-

ние культивированных мезенхимальных стволовых клеток крыс (МСКк) в количестве 10 000 клеток/0,1мл в виде суспензии. Выведение животных из эксперимента осуществляли по графику: на седьмые сутки после введения МСКк — 7 животных, на четырнадцатые сутки после введения МСКк — 8 животных. У всех животных после выведения из эксперимента травмированные конечности отчленились, освобождались от кожных покровов, фиксировались в 10% нейтральном формалине, окрашивались гематоксилином и эозином и изучались в световом микроскопе.

Результаты исследований
Фенотипические особенности
некоммитированных и остеоиндуцированных
МСК, их значение в остеогенезе

При изучении антигенов межклеточной адгезии на поверхности МСК были выявлены CD44, CD166, CD56 и CD54. Из таблицы 1 видно, что уровень экспрессии CD44 является достаточно высоким (>95%) как в группе некоммитированных, так и в группе коммитированных МСК. CD166 в обеих группах МСК также экспрессируется на высоком уровне >76%, который сравним с уровнем экспрессии CD44. Это свидетельствует о важной роли данных клеток в течение раневого процесса при их трансплантации в об-

ласть костного дефекта. При фенотипировании антигена CD56 на поверхности МСК отмечено достоверное снижение ($p < 0,05$) уровня его экспрессии остеогенными линиями: от 75% активности в некоммитированной группе практически до нуля в коммитированной, что, вероятно, обусловлено фактом отсутствия экспрессии данного маркера остеócитами *in vivo*. Экспрессия CD54 находилась на стабильном среднем уровне в обеих группах МСК.

При исследовании рецепторов-молекул клеточной адгезии, которым принадлежит роль в определении межклеточных взаимосвязей в системе «активированный/неактивированный эндотелий — клетка», были получены данные в пользу позитивной экспрессии на поверхности МСК для L-селектина — CD62L. Отмечен незначительный уровень его экспрессии (до 40%) на поверхности обеих групп клеток.

Следующим маркером, который экспрессируется обеими группами МСК (антиген активации и костимуляции) является LFA-3, который относится к маркерам группы, образованной на основании их возможности участвовать в процессах прямой и опосредованной активации как иммунокомпетентных клеток, так и других клеточных популяций. Из таблицы 1 видно, что LFA-3 экспрессируется обеими группами МСК, однако уровень его экспрессии незначителен и, веро-

Таблица 1

Уровень экспрессии молекул мембранных антигенов на поверхности некоммитированных и коммитированных МСК 1—4 пассажей ($\bar{X} \pm m$, баллы)

CD	Антиген	МКА	Некоммитированные МСК		Коммитированные МСК	
			№ пассажира культуры		№ пассажира культуры	
			1-2	3-4	1-2	3-4
Антигены межклеточной адгезии						
44	HCAM	L178	4,8±0,2	4,9±0,1	4,9±0,1	5,0±0,1
166	ALCAM	3A6	3,8±0,2	3,9±0,1	4,8±0,1	4,9±0,1
56	NCAM	B159	3,8±0,2	3,9±0,1	0,3±0,1*	0,2±0,1*
54	ICAM-1	LB-2	1,2±0,2	2,5±0,2	2,7±0,1*	2,8±0,1
Антиген адгезии к эндотелиальным клеткам						
62L	L-селектин LECAM-1	Dreg-56	1,8±0,4	1,9±0,2	1,7±0,1	2,1±0,2
Антиген активации и костимуляции						
58	LFA-3	1C3	1,6±0,2	1,6±0,2	1,4±0,2	1,5±0,1
Антигены адгезии к внеклеточному матриксу						
29	интегрин 1	HUTS-21	2,8±0,2	2,7±0,1	3,1±0,2	3,5±0,2*
49a	интегрин 1	SR84	0	0	0,2±0,1	0
49b	интегрин 2	AK-7	3,6±0,2	3,9±0,1	3,5±0,2	3,8±0,1
49c	интегрин 3	С3 II.1	3,2±0,2	3,3±0,1	2,7±0,1	3,0±0,2

Примечание: * — изменения ($p < 0,05$) экспрессии антигенов коммитированными МСК в сравнении с некоммитированными

Уровень экспрессии молекул HLA на МСК 1—4 пассажей ($\bar{X} \pm m$, баллы)

Антиген	МКА	Некоммитированные МСК		Коммитированные МСК	
		№ пассажи культуры		№ пассажи культуры	
		1-2	3-4	1-2	3-4
HLA A,B,C	G46-2.6	0	0	0	0
HLA-DR	TÜ36	0	0	0,3±0,1	0,5±0,1*

Примечание: * — изменение ($p < 0,05$) экспрессии антигена коммитированными МСК в сравнении с некоммитированными

ятнее всего, связан с возможностью включения МСК в воспалительные процессы, которые протекают в костной ране.

Экспрессия группы молекул, включающихся в межклеточную и клеточно-матриксную адгезию, на клеточных культурах обеих групп МСК представлены $\beta 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ субъединицами интегринов. Это позволяет отнести сформированные ими рецепторы к подсемейству VLA-интегринов, которые распознают лиганды, содержащие аминокислотную последовательность Арг-Гли-Асп, и позволяют клеткам присоединяться к таким молекулам внеклеточного матрикса как фибронектин, ламинин и коллаген. На МСК обеих групп $\beta 1$ -цепочка детектировалась при помощи МКА клона HUTS-21, представленного в большинстве клеточной культуры. В группе коммитированных МСК 3—4 пассажей отмечено статистически значимое увеличение ($p < 0,05$) уровня экспрессии CD29 в сравнении с некоммитированными клетками тех же пассажей. Субъединицы $\alpha 2$ и $\alpha 3$ отчетливо визуализировались приблизительно в одинаковом балльном интервале — около 60% CD-позитивных клеток культур в обеих группах МСК.

На основании рангового анализа экспрессию интегриновых субъединиц ($\beta 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$) можно считать стабильной на протяжении культивирования. Так как комбинация $\beta 1$ - и разных α -цепочек формируют рецепторы к компонентам экстрацеллюлярного матрикса, а именно $\alpha 2\beta 1$ -ламинин, коллаген та $\alpha 3\beta 1$ - ламинин, коллаген, фибронектин, можно говорить о наличии полноценных рецепторов к большинству компонентов соединительной ткани, а также о том, что популяции культивированных МСК, как некоммитированных, так коммитированных, могут активно участвовать в остеогенезе при их трансплантации в область костного дефекта. Экспрессия интегриновой $\alpha 1$ -цепочки, субъединицы коллагенового рецептора, обеими группами МСК полностью отсутствовала.

При определении на поверхности культивированных МСК антигенов МНС-комплекса было установлено, что молекулы I класса — HLA-A,B,C и II класса — HLA-DR практически не определялись МКА от момента выделения культуры и не

появлялись в процессе культивирования МСК (табл. 2). Однако имело место незначительное статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение уровня экспрессии HLA-DR коммитированными культурами МСК 3—4 пассажей.

Таким образом, фенотип культивированных некоммитированных МСК человека может быть представлена в виде: CD44^{high}/CD166^{high}/CD58+/CD62L+/CD29+/CD49b+/CD49c+CD56+/CD54+, а фенотип культивированных коммитированных МСК — в виде: CD44^{high}/CD166^{high}/CD58+/CD62L+/CD29+/CD49b+/CD49c+/CD54+/CD56-^{lo}/HLA-DR-^{lo}/щелочная фосфатаза^{high}.

Данные, полученные при фенотипировании некоммитированных и коммитированных МСК, позволяют нам определить функциональные возможности этих клеток (табл. 3).

В зависимости от клеточных популяций CD44 может выполнять различные функции, основными из которых является клеточная адгезия, хоуминг клеток в периферические лимфоидные органы и очаг воспаления, клеточная активация и усиление продукции цитокинов и факторов роста. Lovvorn H. N. с соавт. показали, что при моделировании повреждения фетальных покровных тканей, которые отличаются высоким уровнем экспрессии данного рецептора, в эксперименте при заживлении ран не отмечалось образования рубцов [30]. Возможно, это связано со снижением экспрессии и функциональной активности данного гиалуринового рецептора. В экспериментах было показано, что после повреждения тканей, для формирования грануляций необходима миграция фибробластов в фибриновый матрикс раны, что обеспечивается не только активностью интегриновых рецепторов, но и протеогликановым комплексом, в состав которого входит изоформа CD44H [20].

Основной функцией CD166 (ALCAM), наиболее детально изученной в настоящее время, является активация клеток иммунной системы и инициация межклеточных взаимодействий эпителиальных клеток с лимфоцитами [18, 49].

CD56 является важной молекулой для функционирования остеобластов и МСК. Недавно было показано, что CD56 широко экспрессиру-

Таблиця 3

Функциональные возможности мезенхимальных стволовых клеток

Кластер дифференцирования	Основные функции
Антигены межклеточной адгезии	
CD44	клеточная адгезия, хоуминг клеток в периферические лимфоидные органы и очаг воспаления, клеточная активация и усиление продукции цитокинов и факторов роста
CD166	активация клеток иммунной системы и инициация межклеточных взаимодействий эпителиальных клеток с лимфоцитами
CD56	способствует формированию литического повреждения костной ткани в следствии снижения остеоидной продукции
CD54	активизирует Т-, В-лимфоциты, моноциты и эндотелиальные клетки
Антигены адгезии к эндотелиальным клеткам	
CD62L	способствует хоумингу лейкоцитов
Антигены активации и костимуляции	
CD58	обеспечивает костимулирующий сигнал в иммунном ответе, активизирует киллерные клетки и обеспечивает адгезию киллера к клетке-мишени
Антигены адгезии к внеклеточному матриксу	
CD29	индуцирует остеогенную дифференциацию и продукцию внеклеточного матрикса
CD49b	регулирует экспрессию коллагена I типа и коллагеназы-3, что необходимо для клеточной миграции на коллаген, и регулирует множество систем передачи сигнала и различные клеточные функции
CD49c	активизирует пути сигнальной трансдукции: PI-3K и PI-4K (фосфатидилинозитол-3-киназа и фосфатидилинозитол-4-киназа)

ется остеобластами. Группа британских авторов под руководством R. Grimer [19] предлагают рассматривать CD56 как новый остеобластический маркер. В их исследованиях CD56 экспрессировался остеобластами, клетками периоста МСК в зонах активного формирования кости. При этом CD56 не экспрессируется остеоцитами. Поэтому активность экспрессии CD56 в наших исследованиях достоверно ($p < 0,05$) снижалась в процессе остеогенной индукции МСК.

CD54 способен активизировать не только Т-, В-лимфоциты и моноциты, но и эндотелиальные клетки. Экспрессия CD54 была достоверно больше в начале остеогенной коммитации МСК ($p < 0,05$), что возможно связано с вовлечением данного антигена в процессы васкуляризации и привлечением предшественников остеокластов в место костной резорбции и заживления костной раны.

D62L действует как хоуминговый рецептор для лейкоцитов при их проникновении во вторичные лимфоидные ткани за счет облегчения адгезии лимфоцитов к адрессину, который экспрессируется на активированном эндотелии венул [42].

CD58 является одним из основных антигенов, который определяет функциональную активность лимфоцитов, обеспечивает костимуляционный сигнал в иммунном ответе, активизирует киллерные клетки и обеспечивает адгезию клетки-киллера к клетке-мишени и межклеточ-

ные взаимодействия при воспалительном процессе [17, 38, 48].

Члены $\beta 1$ -интегринового субсемейства (CD29) индуцируют остеогенную дифференцировку МСК, которая обусловлена стимуляцией внутриклеточных сигнальных систем [47]. CD 49b регулирует экспрессию коллагена I типа и коллагеназы-3, что необходимо для клеточной миграции на коллаген [32]. Известно, что ламининовый (ЛН-5) рецептор (CD 49c, $\alpha 3\beta 1$) принимает участие в фосфорилировании остеогенного транскрипционного фактора Runx2/CBFA-1 [37].

Продукция цитокинов костномозговыми мезенхимальными стволовыми клетками

Результаты изучения количественной цитокиновой (ЦК) продукции некоммитированными и коммитированными МСК *in vitro* представлены в таблицах 4, 5.

Из таблицы 4 видно, что максимальная концентрация ЦК в супернатантах некоммитированных культур отмечалась на третьи сутки культивирования. При этом увеличение концентрации всех исследуемых цитокинов имело статистически значимые изменения ($p < 0,05$). Концентрация ЦК с односуточного супернатанта еще не достигала значений трехсуточного, а кондиционированная среда, которая не сливалась с культур в течение пяти суток культивирования, уже показывала

снижение концентрации во всем цитокиновом спектре. Уровень секреции ЦК некоммитированными культурами МСК был взят нами как базовый при данных условиях культивирования.

При анализе продукции ЦК некоммитированными МСК были отмечены статистически значимые изменения концентрации ИЛ-1 β ($p < 0,001$; дисперсионный анализ), ИЛ-2 ($p = 0,007$; дисперсионный анализ), ИЛ-4 ($p = 0,02$; дисперсионный анализ), ИЛ-6 ($p = 0,003$; дисперсионный анализ), ИЛ-8 ($p = 0,003$; по критерию Краскела-Уолиса) и ФНП- α ($p < 0,001$; дисперсионный анализ) в зависимости от суток культивирования.

Из таблицы 5 видно, что четкой линейной зависимости в увеличении или уменьшении секреции ЦК МСК в зависимости от сроков культивирования не отмечалось. Однако при аппроксимации и сглаживании полученных данных отмечалась некоторая тенденция изменения продукции цитокинов МСК. Так, для ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ИЛ-4 отмечалась тенденция к увеличению секреции с 10 по 19 сутки индукции, а для ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНП- α — к снижению секреции ЦК.

В таблице 6 представлены сравнительные данные среднего уровня секреции ЦК некомми-

тированными (1—5 сутки культивирования) и коммитированными (10—19 сутки остеогенной индукции) линиями МСК. Для сравнения также представлены значения концентрации ЦК, которые измерялись в нестимулированных клеточных культурах мононуклеаров периферической крови (МН ПК) здоровых доноров (согласно данным мета-анализа зарубежных исследований) [24, 29].

Интерлейкин 1 β . Средний уровень провоспалительного ИЛ-1 β был достоверно выше в коммитированной группе — 47,8 пг/мл ($p < 0,05$). Его уровень в супернатантах некоммитированных МСК достоверно увеличивался на третьи сутки культивирования до максимального значения — 56,2 пг/мл ($p < 0,05$) и снижался на пятые сутки до 25,4 пг/мл ($p < 0,05$). Продукция этого ЦК коммитированными линиями была в полтора раза больше, чем некоммитированными (32,7 пг/мл), и почти в 5 раз больше чем в культурах МН ПК здоровых доноров. Секреция ИЛ-1 β некоммитированными культурами МСК также была в три раза более высокой, чем в группе МН ПК. Уровень секреции ИЛ-1 β остеиндуцированными клетками достоверно возрастал с 10 по 16 сутки индукции ($p < 0,05$). Важно отметить, что в наших исследованиях впервые показана

Таблица 4

Динамика изменения концентрации ЦК в супернатантах культур некоммитированных МСК в зависимости от сроков культивирования ($\bar{X} \pm m$, пг/мл)

Цитокин	1 сутки (n=30)	3 сутки (n=30)	5 сутки (n=30)
ИЛ-1 β	16,6 \pm 2,0	56,2 \pm 3,6*	25,4 \pm 3,7#
ИЛ-2	3,5 \pm 0,6	14,9 \pm 1,5*	12,6 \pm 0,4*
ИЛ-4	13,1 \pm 1,1	32,6 \pm 1,7*	5,0 \pm 0,8*#
ИЛ-6	86,5 \pm 4,4	112,5 \pm 4,7*	105,1 \pm 2,5*
ИЛ-8	202,2 \pm 5,7	386,1 \pm 30,2*	196,5 \pm 19,2#
ФНП- α	3,9 \pm 1,2	17,7 \pm 1,7*	10,8 \pm 2,6

Примечания:

* — изменения ($p < 0,05$) уровня ЦК в сравнении со значениями на 1-е сутки;

— изменения ($p < 0,05$) уровня ЦК в сравнении со значениями на 3-и сутки

Таблица 5

Динамика изменения концентрации ЦК в супернатантах культур коммитированных по остеогенному пути МСК в зависимости от сроков культивирования ($\bar{X} \pm m$, пг/мл)

Цитокин	10 сутки (n=30)	13 сутки (n=30)	16 сутки (n=30)	19 сутки (n=30)
ИЛ-1 β	43,5 \pm 8,1	30,1 \pm 0,8	67,1 \pm 4,0*#	50,7 \pm 3,4
ИЛ-2	14,0 \pm 1,2	11,2 \pm 0,7	16,2 \pm 1,0#	16,2 \pm 1,1#
ИЛ-4	9,3 \pm 1,5	22,4 \pm 1,5*	6,3 \pm 1,1#	19,5 \pm 1,0*\$
ИЛ-6	282,0 \pm 23,4	279,5 \pm 8,0	305,2 \pm 8,4	239,4 \pm 4,4\$
ИЛ-8	1125,0 \pm 55,0	1328,0 \pm 203,0	981,0 \pm 115,0	831,0 \pm 18,0*#
ФНП- α	11,6 \pm 0,8	18,5 \pm 0,8*	11,1 \pm 0,4#	5,4 \pm 0,4*#

Примечания:

* — изменения ($p < 0,05$) уровня ЦК в сравнении со значениями на 10-е сутки;

— изменения ($p < 0,05$) уровня ЦК в сравнении со значениями на 13-и сутки;

\$ — изменения ($p < 0,05$) уровня ЦК в сравнении со значениями на 16-е сутки

Таблиця 6

Средние значения общей концентрации цитокинов в супернатантах некоммитированных (с 1 по 5 сутки культивирования) и коммитированных (с 10 по 19 сутки культивирования) МСК и мононуклеаров периферической крови ($\bar{X} \pm m$, пг/мл)

Цитокин	Некоммитированные МСК (n=90)	Коммитированные МСК (n=120)	Мононуклеары периферической крови (n=6)
ИЛ-1 β	32,7 \pm 4,9	47,8 \pm 3,2*	9,8 \pm 4,8
ИЛ-2	10,4 \pm 1,4	14,4 \pm 0,5*	26,9 \pm 12,9
ИЛ-4	16,9 \pm 3,3	14,4 \pm 1,6	72,0 \pm 15,1
ИЛ-6	101,4 \pm 3,2	276,5 \pm 5,6*	40,1 \pm 3,4
ИЛ-8	262,0 \pm 25,0	1066,0 \pm 43,0*	182,2 \pm 45,4
ФНП- α	10,8 \pm 1,6	11,6 \pm 1,1	5,4 \pm 1,6

Примечания:

* — статистически значимые изменения показателей ($p < 0,05$).

на секреция ИЛ-1 β культивированными МСК (в отличие от ИЛ-1 α). В зарубежной литературе данных относительно секреции ИЛ-1 β остеобластами или МСК нами найдено не было.

Интерлейкин 2. Также впервые нами была выявлена продукция ИЛ-2 культивированными МСК. Его средний уровень, был достоверно больше в коммитированной группе ($p < 0,05$). Уровень ИЛ-2 в супернатантах некоммитированных МСК достоверно возрастал на третьи сутки культивирования до 14,9 пг/мл ($p < 0,05$) и до 12,6 пг/мл на пятые сутки ($p < 0,05$). Продукция ИЛ-2 остеоиндуцированными линиями, была почти в 1,5 раза больше, чем некоммитированными (10,4 пг/мл). Однако секреция ИЛ-2 некоммитированным МСК была в 2,5 раза ниже по сравнению с группой МН ПК. Секреция данного ЦК остеоиндуцированными линиями, достоверно возрастала с 13 по 19 сутки индукции ($p < 0,05$).

Интерлейкин 4. Концентрация противовоспалительного ИЛ-4 в наших исследованиях была значительно меньшей в супернатантах некоммитированных (16,9 пг/мл) и коммитированных (14,4 пг/мл) культур, чем в группе МН ПК здоровых доноров. Различия между средними значениями уровня секреции ИЛ-4 некоммитированными и коммитированными линиями МСК достоверных различий не имели. Однако, уровень этого ЦК в супернатантах некоммитированных МСК статистически достоверно возрастал с 1 по 3 сутки культивирования ($p < 0,05$) и снижался на пятые сутки почти в 6 раз ($p < 0,05$). В остеоиндуцированных линиях клеток уровень секреции ИЛ-4 сначала достоверно возрастал с 10 по 13 сутки индукции ($p < 0,05$), снижался на 16 сутки ($p < 0,05$), и вновь увеличивался к 19 суткам индукции ($p < 0,05$).

Интерлейкин 6. Средний уровень этого ЦК в обеих группах был значительно выше, чем всех остальных цитокинов ЦК. Продукция ИЛ-6 остеоиндуцированными клетками была в 2,7 раза больше, чем некоммитированными, и почти в 7 раз выше, чем в культурах МН ПК здо-

ровых доноров. Уровень ИЛ-6 в супернатантах некоммитированных МСК статистически достоверно возрастал на 3 сутки культивирования до 112,5 пг/мл ($p < 0,05$) и до 105,1 пг/мл на 5 сутки ($p < 0,05$) в сравнении с первыми сутками. Максимальной концентрации в супернатантах коммитированных клеток ИЛ-6 достигал на 16 сутки — 305,2 пг/мл ($p < 0,05$), а его статистически достоверное уменьшение отмечалось на 19 сутки — до 239,4 пг/мл ($p < 0,05$).

Интерлейкин 8. Вместе с ИЛ-6, уровень ИЛ-8 (262 пг/мл и 106,6 пг/мл соответственно) в обеих группах МСК был значительно более высоким, чем всех других ЦК, в том числе и в группе МН ПК. Продукция ИЛ-8 коммитированными линиями была в четыре раза большей, чем некоммитированными, и почти в шесть раз превышала таковую в культурах МН ПК. Секреция ИЛ-8 некоммитированными МСК также была в 1,4 раза большей, чем в группе МН ПК. Уровень данного ЦК в супернатантах некоммитированных МСК, достоверно возрастал на третьи сутки культивирования до 386,1 пг/мл ($p < 0,05$) и снижался до 196,5 пг/мл на пятые сутки ($p < 0,05$). Секреция ИЛ-8 коммитированными МСК достоверно уменьшалась с 10 по 19 сутки ($p < 0,05$). Максимальной концентрация данного ЦК была в супернатантах коммитированных МСК на 13 сутки индукции — 132,8 пг/мл ($p < 0,05$).

Фактор некроза опухоли — альфа. По уровню секреции ФНП- α в обеих группах МСК достоверных отличий отмечено не было. Своей максимальной концентрации (56,2 пг/мл), в супернатантах некоммитированных МСК этот ЦК достигал на 3 сутки. Концентрация ФНП- α в супернатантах коммитированных клеток достоверно возрастала с 10 по 13 сутки до 18,5 пг/мл ($p < 0,05$), а потом постепенно снижалась до минимального значения (5,4 пг/мл) с 13 по 19 сутки остеогенной индукции МСК ($p < 0,05$).

В таблице 7 представлены основные функции цитокинов, которые были изучены нами в супер-

**Основные функции цитокинов, выявленных в супернатантах при культивировании
некоммитированных и коммитированных МСК**

ЦК	Основные функции
ИЛ-1	стимулирует продукцию остеокластоподобных многоядерных клеток, способствует развитию воспалительных реакций, стимулирует выделение фактора активации тромбоцитов, супрессирует хондрогенез, и матриксные протеины кости (КМБ-2 и КМБ-9)
ИЛ-2	обеспечивает пролиферацию и дифференцирование клеток
ИЛ-4	регулирует гомеостаз костной ткани — угнетает RANKL-индуцированную (NF- κ B и Ca ²⁺ -зависимую передачу сигнала) костную резорбцию
ИЛ-6	принимает участие в иммунном ответе, воспалительной реакции и гемопоэзе
ИЛ-8	имеет выраженные противовоспалительные свойства
ФНП- α	резорбция костной и хрящевой тканей, инициация ангиогенеза, принимает участие в процессах деструкции и репарации, стимулирует продукцию остеокластоподобных многоядерных клеток и активации резорбтивной активности остеокластов

натантах при культивировании некоммитированных и коммитированных МСК.

ИЛ-1 является одним из основных регуляторов иммунного и воспалительного ответа. Он практически действует на все типы клеток. Выделяется в основном моноцитами и макрофагами, а также кератиноцитами, хондроцитами, клетками Лангерганса, клетками глии, мезангиальными клетками, эндотелиоцитами, В- и Т-лимфоцитами. Его индукторами являются эндотоксины грамм-негативных бактерий и вирусов и экзотоксины и пептидогликаны бактерий; сам ИЛ-1 и ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-12, ФНП- α .

Среди иммунологических возможностей ИЛ-1 наиболее важными являются индукция продукции ИЛ-2 и антител В-лимфоцитами, факторов колонизации различными клетками, а также образования нейтрофилов и моноцитов и их хемотаксиса, резорбции и перестройки кости и пролиферации фибробластов и синовиоцитов [16]. Известно, что ИЛ-1 обладает супрессивным эффектом на хондрогенез, и матриксные протеины кости КМБ-2 и КМБ-9 [41]. Резорбция кости регулируется ЦК стромальных клеток, которые опосредованно воздействуют на образование и активацию остеокластов. ИЛ-1 и ФНП- α индуцируют резорбцию костной ткани при помощи стимуляции продукции остеокластоподобных многоядерных клеток и увеличения костеразрушающей активности образованных остеокластов [13].

Основным результатом действия ИЛ-2 на клетки, является обеспечение их пролиферации. Именно эта биологическая активность ИЛ-2 определяет его как типовой фактор роста клеток лимфомиелоидного ряда [12,52].

Рецепторы к ИЛ-4 находятся на Т- и В-лимфоцитах, мастоцитах, моноцитах, макрофагах, фибробластах, стромальных клетках костного мозга, а также на гемопоэтических и множестве других клеток [40]. Этот ЦК принимает участие в развитии костномозговых клеток предшественников [33].

ИЛ-6 принимает участие в иммунном ответе, воспалительных реакциях и гемопоэзе. Он оказывает влияние на трансформацию В-клеточных линий, их дифференциацию, стимулирует секрецию IgG, усиливает ИЛ-3-зависимую пролиферацию стволовых кроветворных клеток. Вместе с ИЛ-3 стимулирует клетки-предшественники костного мозга, регулирует метаболизм и стимуляцию резорбции костной ткани [34].

Как и другие ЦК, ИЛ-8 представляет собой индуцибельный белок. Его продукция начинается после действия на клетки митогенов, продуктов метаболизма вирусов и бактерий, эндогенных регуляторов: ИЛ-1, ИЛ-3, ФНП, ГМ-КСФ и др. ИЛ-8 обладает выраженными провоспалительными свойствами и его основной первичной функцией состоит в том, что он выступает как хеммоаттрактант для нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов. [14, 31,50].

ФНП- α , являясь провоспалительным ЦК, осуществляет регуляторные и эффекторные функции в иммунном ответе и воспалении, регулирует пролиферацию, активацию и дифференциацию многих клеточных типов и может индуцировать их к апоптозу. Рецепторы к ФНП- α имеются практически на всех клетках, которые содержат ядро. Главными индукторами ФНП- α являются вирусы, другие микроорганизмы и продукты их метаболизма. Кроме того, в роли индукторов могут выступать как сам ФНП- α (аутокринно), так и некоторые ЦК: ИЛ-1, ИЛ-2, ГМ-КСФ, γ -ИФН. Ингибиторами продукции ФНП- α являются глюкокортикостероиды, ТФР- β , ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13 и ПГЕ2 [39].

Таким образом, обе группы МСК при их культивировании активно продуцируют как провоспалительные так и противовоспалительные цитокины — ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНП- α и ИЛ-4. Впервые выявлена секреция ИЛ-1 β и ИЛ-2 культивированными МСК, а также впервые было отмечено увеличение уровня секреции ИЛ-6 и ИЛ-8 культивированными МСК, особенно коммитированными клетками.

MIRCERA®

метокси полиэтилен гликоль-эпоэтин бета

Длительная активация. Стабильный эффект.

Roche

Традиции создания новых направлений

ЛЕЧЕНИЕ АНЕМИИ СТАЛО ЕЩЕ БОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫМ И УДОБНЫМ!



МИРЦЕРА
первый и единственный
активатор рецепторов эритропоэтина длительного действия,
в отличие от стандартных эритропоэтинов
при режиме введения 1 раз в месяц
позволяет плавно достигать и стабильно удерживать
уровень целевого Hb (п/к и в/в),
обеспечивает эффективное и наиболее комфортное лечение анемии

Р.С. МОЗ Украины № 702/07-300200000 от 13.12.2007г.

WWW.MIRCERA.COM.UA

«ГОРЯЧАЯ ЛИНИЯ» **8-800-50-454-50**
(звонки бесплатные по Украине)

ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО КОМПАНИИ «ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ Лтд.» в УКРАИНЕ
01001, г. Киев, пер. Музейный, 2-Б, 2-этаж
www.roche.com.ua

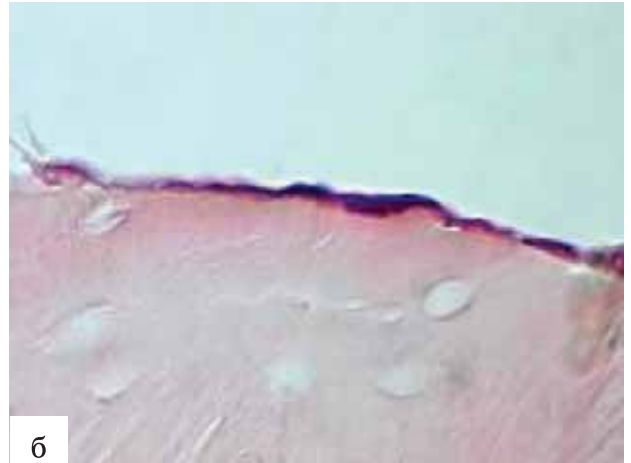
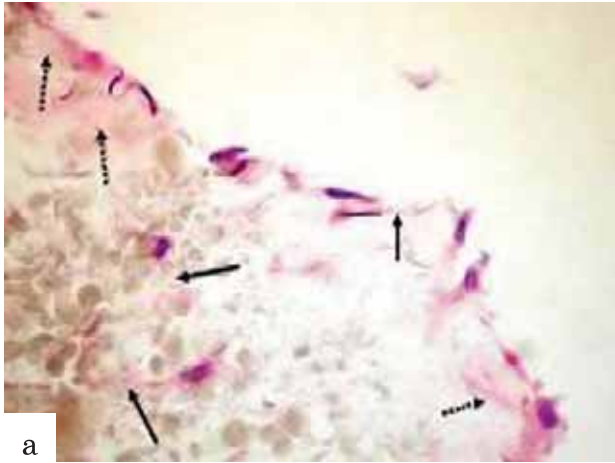


Рис. 1 Пролиферация МСК в многокомпонентном коллагеновом матриксе (а): межклеточные контакты (обычные стрелки), отложение экстрацеллюлярного матрикса (пунктирные стрелки). Культивированные МСК на ДМК (б) (гематоксилин-эозин, ув. 400)

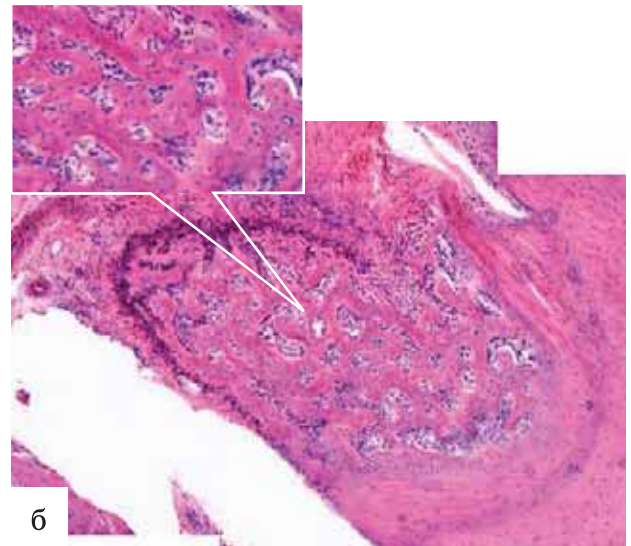
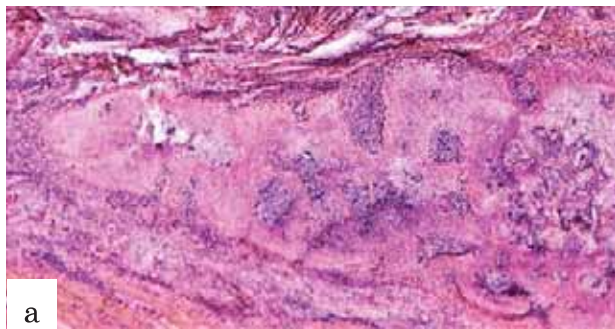


Рис. 2 Ремоделирование ткани костных фрагментов (микрофотоомонтаж, гематоксилин-эозин, ув. 75)

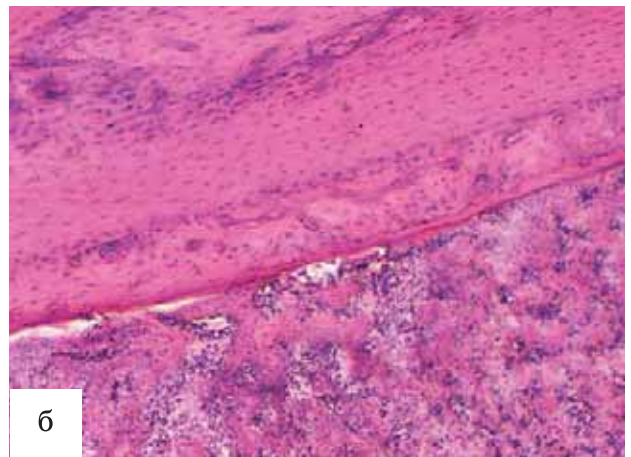
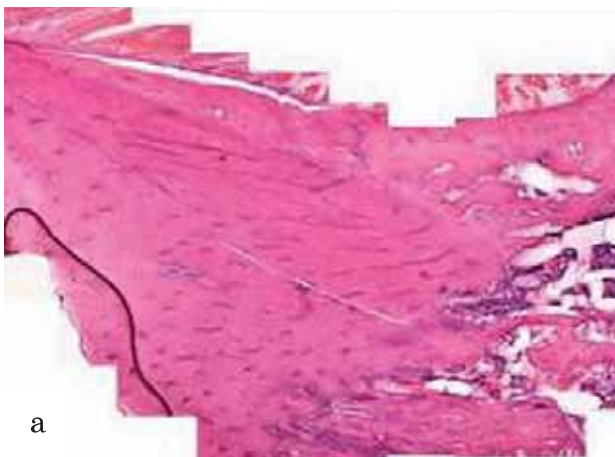


Рис. 3 Процесс остеогенеза в области трансплантации МСК (микрофотоомонтаж, гематоксилин-эозин, ув. 75)

Модель реципиентного ложа

Данные наших экспериментальных исследований показали, что при культивировании в МКМ клетки пролиферировали и равномерно занимали всю толщину носителя. В процессе пролиферации клеток МКМ подвергался контракции, максимальная степень которой достигала 1/3 от его первоначального объема. К концу второй недели культивирования весь МКМ был полностью заполнен клетками, которые сохраняли свою жизнеспособность, формировали межклеточные контакты и откладывали компоненты экстрацеллюлярного матрикса (рисунок 1 а на цветной вставке). В отдельных участках МКМ наблюдалось скопление пролиферирующих и откладывающих экстрацеллюлярный матрикс МСК. В процессе культивирования МСК на ДМК наблюдали полную адгезию клеток к поверхности костного матрикса, их пролиферацию и миграцию. К концу второй недели на поверхности ДМК клетки располагались плотным монослоем, напоминая по своей архитектонике клетки выстилающие кость (рисунок 1 б на цветной вставке).

Морфологические изменения, происходящие в костной ткани очага травматического повреждения, происходящие в результате воздействия трансплантированных МСК

При изучении гистоморфологических препаратов межфрагментарной области перелома на 7—10 сутки после трансплантации МСК отмечается выраженное образование остеогенной ткани с формированием примитивных костных балок. Причем остеогенез происходит в строго ограниченном пространстве, по своей форме напоминающем участок костного фрагмента (рис. 2 а, 2 б). В межбалочных пространствах, наряду с остеогенной тканью, имеется значительное количество остеокластов. Это свидетельствует о том, что остеогенные и остеолитические процессы в этой области протекают параллельно и по своей природе напоминают процесс ремоделирования костной ткани.

На 14—16 сутки после трансплантации МСК отмечалось формирование новой костной ткани губчатого строения. По сравнению с 7—10-ми сутками вновь образовавшаяся костная ткань была более зрелой, а количество остеокластных клеточных элементов в межбалочных пространствах значительно уменьшалось (рисунок 3 а на цветной вставке). Формирование новой молодой костной ткани происходило в месте завершенного процесса ремоделирования кости (рисунок 3 б на цветной вставке).

Обсуждение полученных результатов

Ранее нами высказывалось предположение о том, что в области трансплантации МСК формирование костной ткани происходит по типу прямого остеогенеза [6]. Одним из подтверждений данного предположения являются наблюдавшие-

ся нами при культивировании МСК на коллагеновом матриксе скопления пролиферирующих клеток, формирование между ними взаимосвязей и отложение компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Эти процессы по своей природе напоминают формирование остеогенных островков, характерных для процессов прямого остеогенеза. Расположение клеток в коллагеновом матриксе по своей архитектонике напоминает грубоволокнистую костную ткань, образование которой происходит тогда, когда остеобласты формируют остеоид с высокой скоростью [2]. Формирование взаимосвязи между костной тканью, образующейся в области трансплантации, и подлежащей реципиентной костью, происходит, по-видимому, посредством МСК, которые образуют на подлежащей костной ткани монослой (последний, как отмечалось выше, напоминает по своей архитектонике клетки, выстилающие кость). Контактная через костные каналы с остеоцитами реципиентной костной ткани (рисунок 4), клетки монослоя активизируются и включаются в процесс остеогенеза.

В физиологических условиях в костной ткани постоянно происходят взаимосвязанные и последовательно происходящие процессы резорбции и костеобразования. Формирование костной ткани возможно только при наличии клеток двух дифферонов — остеобластического и остеокластического, которые согласно теории сопряжения функции остеокластов и остеобластов связаны между собой и потенцируют дифференцировку и активацию друг друга [2]. Если клетки остеобластического дифферона попадают в реципиентное ложе в результате их трансплантации, то остеокласты, являясь производными моноцитов, попасть в реципиентное ложе могут только с кровотоком. Вероятнее всего, в реципиентном ложе часть трансплантированных МСК дифференцируются в эндотелиоцитарном направлении, участвуют в формировании сосудистого русла и тем самым способствуют привлечению клеток остеокластического дифферона в область трансплантации МСК и созданию клеточных условий для костеобразования.

Характерные для ремоделирования костной ткани процессы резорбции и формирования костной ткани наблюдались нами в области трансплантации МСК как в эксперименте, так и в клинике. Разрушение некротизированных костных структур и формирование на их месте новых позволяет предположить, что МСК через механизмы сопряженного функционирования остеобластов и остеокластов способствуют восстановлению процессов ремоделирования костной ткани. В пользу данного предположения свидетельствуют и данные экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*. На рисунке 5 представлен механизм участия МСК в процессе ремоделирования некротизированной костной ткани.

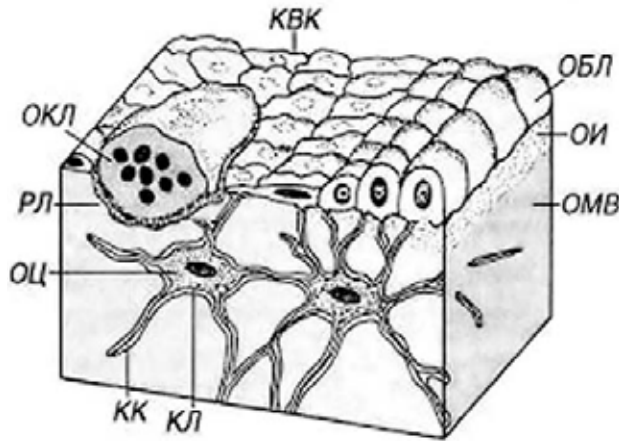


Рис. 4. Клетки костной ткани по В. Л. Быкову [2]: ОБЛ — остеобласты (активные); КВК — клетки выстилающие кость (неактивные остеобласты); КЛ — костные лакуны с телами остеоцитов (ОЦ); КК — костные каналцы, содержащие отростки ОЦ; ОКЛ — остеокласт в резорбционной лакуне (РЛ); ОИ — остеоид; ОМВ — обызвествленное межклеточное вещество.



Рис. 5 Механизмы влияния МСК на процессы ремоделирования костной ткани

Выводы

Таким образом, представленные нами данные свидетельствуют о том, что некоммутированные МСК экспрессируют на своих мембранах CD44^{high}/CD166^{high}/CD58⁺/CD62L⁺/CD29⁺/CD49b⁺/CD49c⁺/CD56⁺/CD54⁺, а коммутированные по остеогенному типу МСК — CD44^{high}/CD166^{high}/CD58⁺/CD62L⁺/CD29⁺/CD49b⁺/CD49c⁺/CD54⁺/CD56^{-/lo}/HLA-DR^{/lo}/щелочная

фосфатаза^{high}. Наряду с экспрессией этих кластеров дифференцирования, как некоммутированных, так и коммутированных по остеогенному типу МСК в процессе культивирования активно продуцируют провоспалительные и противовоспалительные цитокины — ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНП-α и ИЛ-4. Причем в зависимости от сроков культивирования происходит увеличение уровня секреции ИЛ-6 и ИЛ-8 клетками,

особенно коммитированными. Это свидетельствует о том, что как некоммитированные, так и коммитированные по остеогенному пути МСК принимают эффективное участие во взаимосвязи с иммунокомпетентными клетками и активно участвуют в процессы ремоделирования костного матрикса и формировании костной ткани в целом.

Процессы остеогенеза, протекающие в области трансплантации МСК, зависят от условий, которые существуют в костном реципиентном ложе. При наличии дефектов кости формирование новой костной ткани идет по типу прямого остеогенеза с формированием на ранних стадиях грубоволокнистой костной ткани. Образование взаимосвязи между вновь образующейся остеогенной тканью и реципиентной костью осуществляются за счет трансплантированных МСК и возможно только при наличии в реципиентной кости живых функционирующих остеоцитов. Наряду с формированием остеогенной ткани, трансплантированные МСК способствуют ангио-

генезу в реципиентном ложе и привлечению в область трансплантации клеток остеокластического дифферона.

При нарушении остеорепаративных процессов в области травматического повреждения, обусловленных гибелью клеточных элементов кости на значительном расстоянии от линии перелома, в области трансплантации МСК протекают два противоположных процесса — остеолиз и образование новой костной ткани. Вначале эти процессы протекают в пространстве, ограниченном костным фрагментом с погибшими клеточными элементами (остеонекроз), — по своей природе эти процессы напоминают ремоделирование костной ткани. После того как происходит восстановление клеточной структуры некротизированного костного фрагмента, вокруг него из МСК происходит активное образование новой молодой костной ткани.

Литература

1. Бруско А.Т., Гайко Г.В. Функциональная перестройка костей и ее клиническое значение. — Луганск, Луганский государственный медицинский университет, 2005. — 212 с.
2. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека). — СПб.: СОТИС, 2002. — 520 с.
3. Гололобов В.Г., Деев Р.В. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон // Морфология (Morphology). — 2003. — Том 123, №1. — С. 9-19.
4. Данилов Р.К., Боровая Т.Г., Ключков Н.Д. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и репаративной регенерации тканей (некоторые итоги XX века и перспективы дальнейших исследований) // Морфология. — 2000. — Том 118, № 4 — С. 7-16.
5. Докторов А. А., Пак Гван Чор Морфофункциональная характеристика эндоста в связи с проблемой ремоделирования кости // Архив патологии. — 1998. — Том 60, № 5. — С. 19-23.
6. Казаков В.Н., Климовицкий В.Г., Гринь В.К., Пастернак В.Н., Оксимец В.М., Попандопуло А.Г., Верещагин С.И., Зубов Д.А. Трансплантация аутологичных стромальных стволовых клеток как метод восстановления клеточных источников репарации (пилотные исследования) // Травма. — 2006. — Том 7, № 3. — С. 368-377.
7. Климовицкий В.Г., Оксимец В.М., Черныш В.Ю., Попандопуло А.Г., Оберемко А.В. Влияние механизма травмы на состояние периостальных источников остеорепарации // Травма. — 2008. — Том 9, № 4. — С. 388-382.
8. Клишов А.А., Графова Г.Я., Хилова Ю.К., Гололобов В.Г., Ченцова М.И. Клеточно-дифферонная организация тканей и проблема заживления ран // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. — 1990. — Том 98, №4. — С. 5-23.
9. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сарман В.М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки. — Черновцы: Золоті литаври, 2004.-505 с.
10. Саркисов Д.С. Очерки истории общей патологии / АМН СССР. — М.: Медицина, 1988. — 336 с.
11. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. — М.: «Медицина», 1973. — 222 с.
12. A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions / A. Bodnár, E. Nizsálóczy, G. Mocsár [et al.] // Immunol. Lett. — 2008. — Vol. 116, № 2. — P. 117—125.
13. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1 alpha and TNF alpha / N. Tani-Ishii, A. Tsunoda, T. Teranaka [et al.] // J. Dent. Res. — 1999. — Vol. 78. — P. 1617—1623.
14. Baggiolini M. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine / M. Baggiolini, I. Clark-Lewis // FEBS Lett. — 1992. — Vol. 307, № 1. — P. 97—101.
15. Connolly J.F. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis // Clin. Orthop. Relat. Res. — 1998. — N 355, Suppl. — P. S257-S266.
16. Dinarello C. A. The interleukin-1 family : 10 years of discovery / C. A. Dinarello // FASEB J. — 1994. — Vol. 8, № 15. — P. 1314—1325.
17. Existence of functionally distinct Thy 1+ and Thy-1— human female reproductive tract fibroblasts / L. Koumas, A. E. King, H. O. Critchley [et al.] // Am. J. Pathol. — 2001. — Vol. 159. — P. 925—935.
18. Expression and characterization of a novel CD6 ligand in cells derived from joint and epithelial tissue / M. K. Saifullah, D. A. Fox, S. Sarkar [et al.] // J. Immunol. — 2004. — Vol. 15, № 10. — P. 6125—6133.
19. Extendible replacements of the proximal tibia for bone tumors / R. J. Grimer, M. Belthur, S. R. Carter [et al.] // J. Bone Joint Surg. (Br). — 2000. — Vol. 82. — P. 255—259.
20. Fibroblast invasive migration into fibronectin/fibrin gels requires a previously uncharacterized dermatan sulfate-CD44 proteoglycan / R. A. Clark, F. Lin, D. Greiling [et al.] // J.

- Invest. Dermatol. — 2004. — Vol. 122, № 2. — P. 266—277.
21. Friedenstain A.J., Petrakova K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells // *J. Embriol. Exp. Morphology*. — 1966. — No16. — P. 381-390.
 22. Gangji V., Toungouz M., Hauzeur J.P. Stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head // *Expert. Opin. Biol. Ther.* — 2005. - Vol. 5, N 4. — P. 437-442.
 23. Goel A., Sangwan S.S., Siwach R.C., Ali A.M. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non union // *Injury*. — 2005. — Vol. 36, N 1. — P. 203-206.
 24. Human IL-1 β ELISA Kit II. Instruction Manual BD OptEIA. — San Diego : Becton, Dickinson and Co., USA, 2005. — 15 p.
 25. Human IL-2 ELISA Kit II. Instruction Manual BD OptEIA. — San Diego: Becton, Dickinson and Co., USA, 2005. — 16 p.
 26. Human IL-4 ELISA Kit II. Instruction Manual BD OptEIA. — San Diego : Becton, Dickinson and Co., USA, 2005. — 16 p.
 27. Human IL-6 ELISA Kit II. Instruction Manual BD OptEIA. — San Diego : Becton, Dickinson and Co., USA, 2005. — 16 p.
 28. Human IL-8 ELISA Kit II. Instruction Manual BD OptEIA. — San Diego : Becton, Dickinson and Co., USA, 2005. — 16 p.
 29. Human TNF ELISA Kit II. Instruction Manual BD OptEIA. — San Diego : Becton, Dickinson and Co., USA, 2005. — 16 p.
 30. Hyaluronan receptor expression increases in fetal excisional skin wounds and correlates with fibroplasia / H. N. Lovvorn, D. L. Cass, K. G. Sylvester [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* — 1998. — Vol. 33, № 7. — P. 1062—1070.
 31. IL-6 and IL-8 production by human bone marrow stromal cells / F. Rougier, E. Cornu, V. Praloran [et al.] // *Cytokine*. — 1998. — Vol. 10, № 2. — P. 93—97.
 32. Integrin $\alpha 2\beta 1$ promotes activation of protein phosphatase 2A and dephosphorylation of Akt and Glycogen synthase kinase 3β / J. Ivaska, L. Nissinen, N. Immonen [et al.] // *Mol. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 22, № 5. — P. 1352—1359.
 33. Izuhara K. IL-4 and IL-13 : their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies / K. Izuhara, K. Arima, S. Yasunaga // *Current drug targets. Inflamm. and allergy*. — 2003. — Vol. 1, № 3. — P. 263—269.
 34. Jones S. A. Directing transition from innate to acquired immunity : defining a role for IL-6 / S. A. Jones // *J. Immunol.* — 2005. — Vol. 175, № 6. — P. 3463—3468.
 35. Kawate K., Yajima H., Ohgushi H. at al. Tissue engineered approach for the treatment of steroid induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula // *Artif. Organs*. — 2006. — Vol. 30, N 12. — P. 960-962.
 36. Kuznetsov S. A., Robey P. G. A look at the history of bone marrow stromal cells // *Graft*. — 2000. — Vol. 3, N 6. — P. 278-283.
 37. Laminin-5 Induces Osteogenic Gene Expression in Human Mesenchymal Stem Cells through an ERK-dependent Pathway / R. F. Klees, R. M. Salaszyk, K. Kingsley [et al.] // *Mol. Biol. Cell*. — 2005. — Vol. 16, № 2. — P. 881—890.
 38. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens / D. Mason, P. André, A. Bensussan [et al.] // *Proceedings of the 7-th International Workshop and Conference : 2000 Jun 19—23, Harrogate, United Kingdom*. — New York : Oxford University Press Inc., 2002. — P. 793—794.
 39. Locksley R. M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology / R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo // *Cell*. — 2001. — Vol. 104, № 4. — P. 487—501.
 40. Maeda S. Inflammatory cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) / S. Maeda, Y. Yanagihara // *Nippon Rinsho*. — 2001. — Vol. 59, № 10. — P. 1894—1899.
 41. Majumdar M. K. BMP-2 and BMP-9 promote chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcome the inhibitory effect of IL-1 / M. K. Majumdar, E. Wang, E. A. Morris // *J. Cell. Physiol.* — 2001. — Vol. 189, № 3. — P. 275—284.
 42. Nicholson I. C. CD62L (L-selectin) / I. C. Nicholson // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. — 2003. — Vol. 16, № 2. — P. 144—146.
 43. Niemeyer P., Krause U., Kasten P. at oll. Mesenchymal Stem Cell-Based HLA-Independent Cell Therapy for Tissue Engineering of Bone and Cartilage // *Current Stem Cell Research and Therapy*. — 2006. — Vol. 1, N 1. — P. 21-27.
 44. Noshi T., Yoshikawa T., Ikeuchi M., at all. Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein // *J. Biomed. Mater. Res*. — 2000. — Vol. 52, N 4. — P. 621-630.
 45. Oyajobi B.O., Lomri A., Hott M. Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody // *J. Bone Miner. Res*. — 1999. — V. 14, N 3. — P. 351-361.
 46. Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Kutepov S.M., Mukhachev V., Lavroukov A., Kon E., Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344, N 5. — P. 385-386.
 47. Schwartz M. A. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads / M. A. Schwartz, M. H. Ginsberg // *Nat. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 4. — P. 65—68.
 48. Soluble and cell-associated forms of the adhesion molecule LFA-3 (CD58) are differentially regulated by inflammatory cytokines / A. C. Kirby, P. Cahen, S. R. Porter [et al.] // *Cell Adhes. Commun.* — 2000. — Vol. 7, № 6. — P. 453—464.
 49. Swart G. W. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration / G. W. Swart // *Eur. J. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 81, № 6. — P. 313—321.
 50. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction / A. Yuan, J. J. Chen, P. L. Yao [et al.] // *Front. Biosci.* — 2006. — Vol. 10. — P. 853—865.
 51. Turksen K., Aubin J.E. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells // *J. Cell Biol.* — 1991. — V. 114, N2. — P. 373-384.
 52. Waldmann T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15 : implications for cancer therapy and vaccine design / T. A. Waldmann // *Nature Rev. Immun.* — 2006. — Vol. 6, № 8. — P. 595—601.

ГИПЕРТРОФИЧЕСКАЯ КАРДИОМИОПАТИЯ: ГДЕ МЫ СЕГОДНЯ В ПОНИМАНИИ ПРОБЛЕМ ПАТОФИЗИОЛОГИИ, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ?

*Кнышов Г. В., Залевский В. П., Зиньковский М. Ф., Руденко К. В., Распутняк О. В.,
Бешляга В. М., Кравчук Б. Б., Дзахоева Л. С. Захарова В. П., Дырда М. Н., Билинский Е. А.,
Лесничай В. Н., Пунщикова Е. А., Костенко Ю. А.*

Национальный институт сердечно-сосудистой хирургии им. Н. М. Амосова АМН Украины, Киев

Несмотря на то, что прошло уже 50 лет с момента первого описания гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП), до сегодняшнего дня нет окончательно сформированного правильного понимания патофизиологии этого заболевания. Остается неясным, почему различные по своей сути методы лечения этой патологии одинаково положительно влияют на гемодинамические проявления заболевания (систолический градиент давления на выходном тракте (ВТ) левого желудочка (ЛЖ) и митральную регургитацию) и на клиническую симптоматику, что затрудняет выбор оптимальной стратегии в лечении каждого конкретного пациента.

Цель работы состояла в том, чтобы проанализировать отдаленные результаты хирургического лечения и двухкамерной электрокардиостимуляции у пациентов с обструктивной ГКМП, а также изучить риск внезапной смерти у пациентов с ГКМП, которые наблюдались в нашем институте в течение 15 лет (с 1992 по 2008 год).

Материал и методы. Обследовано 184 пациента с ГКМП (121 мужчин и 63 женщин). Средний возраст пациентов составил $31,7 \pm 3,2$ лет. Всем пациентам, кроме общепринятых методов исследования, выполнены комплексная эхокардиография (ЭхоКГ), коронарорентрикулография.

У 5 больных последовательность возбуждения ЛЖ исследовали с помощью изучения распространения потенциала действия в режиме реального времени с использованием навигационной системы электроанатомического картирования CARTO XP.

Группу 1 составили 38 пациентов, которым были имплантированы двухкамерные искусственные водители ритма и 3 пациента, которым были имплантированы двухкамерные кардиовертеры-дефибрилляторы. Группу 2 составили 22 пациента, которые подверглись оперативному лечению.

Результаты и обсуждение. Двухкамерная электрокардиостимуляция (ЭКС) приводила к падению систолического градиента давления на ВТ ЛЖ от $66,7 \pm 9,6$ до $29,3 \pm 5,3$ мм рт. ст., к значительному уменьшению обратного тока на митральном клапане у 37 из 41 больных в отдаленных сроках наблюдения от 1 до 10 лет.

Хирургическое лечение позволило снизить систолический градиент давления на ВТ ЛЖ с $77,3 \pm 4,3$ до $42,2 \pm 5,5$ мм рт. ст. 2 больных (9%) группы 2 умерли внезапно, 2 — в раннем послеоперационном периоде.

Выводы:

1. Обструкция ВТ ЛЖ и митральная недостаточность при ГКМП являются проявлением обструктивной стадии заболевания.
2. В основе прогрессирования заболевания лежит механизм развития запаздывания возбуждения и сокращения верхушечной части ЛЖ относительно выходного тракта.
3. Двухкамерная ЭКС и хирургические методы лечения обструкции ВТ ЛЖ при ГКМП модифицируют нарушение последовательности возбуждения и сокращения ЛЖ, улучшают клинические проявления заболевания.
4. Двухкамерная ЭКС является методом выбора в лечении пациентов с обструктивной ГКМП, у которых ведущим в патогенезе обструкции ВТ ЛЖ является функциональный компонент (запаздывание возбуждения верхушки ЛЖ относительно его выходного тракта).
5. Хирургия является методом выбора в лечении обструктивной ГКМП у тех пациентов, у которых анатомический компонент обструкции превалирует над функциональным.
6. Риск внезапной смерти при ГКМП является высоким у пациентов детского возраста и не зависит от наличия и выраженности обструкции выходного тракта ЛЖ.

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия, двухкамерная электрокардиостимуляция, хирургическое лечение гипертрофической кардиомиопатии, риск внезапной смерти при гипертрофической кардиомиопатии.