

Аллотрансплантация свежeweыделенных и криоконсервированных мезенхимальных эмбриональных клеток, стимулирующая репаративную регенерацию хряща крыс

Е.Б. РЕВЕНКО, В.А. БАБАЛЯН, Н.И. ГОРГОЛЬ, Н.А. ВОЛКОВА, А.Ю. ПЕТРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Allotransplantation of Freshly Isolated and Cryopreserved Mesenchymal Embryonic Cells, Stimulating the Rat's Cartilage Reparative Regeneration

REVENKO E.B., BABALYAN V.A., GORGOL N.I., VOLKOVA N.A., PETRENKO A.YU.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучали влияние свежeweыделенной и криоконсервированной суспензии мезенхимальных эмбриональных клеток (МЭК) на репаративную регенерацию дефекта хряща у крыс при аллогенной трансплантации. Исходным материалом для сравнительного изучения биологического действия на модели регенерирующей хрящевой ткани были избраны МЭК, полученные путем ферментативной и механической дезагрегации тканей эмбрионов крыс 10-14 дней гестации. Жизнеспособность свежeweыделенной суспензии клеток составляла 94-96%, а криоконсервированной - не менее 50%. Для пластики дефекта хряща применяли коллагеновую губку, пропитанную в одном случае свежeweыделенной, в другом - криоконсервированной суспензией МЭК. Показано, что в зоне хрящевого дефекта при аллотрансплантации как свежeweыделенной, так и криоконсервированной суспензии МЭК наблюдается интенсивное протекание биосинтетических и пролиферативных процессов, что приводит к структурной организации и образованию молодой хондронной ткани. Этот факт позволяет рассматривать трансплантацию суспензий как перспективный метод лечения травматических повреждений суставного хряща.

Ключевые слова: мезенхимальные эмбриональные клетки, аллогенная трансплантация, криоконсервирование, репаративная регенерация.

Вивчали вплив свіжоізолюваної та криоконсервованої суспензії мезенхімальних ембріональних клітин (МЕК) на репаративну регенерацію дефекту хряща у пацюків при алогенній трансплантації. Вихідним матеріалом для порівняльного вивчення біологічної дії на моделі регенеруючої хрящової тканини були обрані МЕК, отримані шляхом ферментативної і механічної дезагрегації тканин ембріонів пацюків 10-14 днів гестації. Життєздатність свіжоізолюваної суспензії клітин складала 94-96%, а криоконсервованої – не менше 50%. Для пластики дефекту хряща застосовували колагенову губку, просочену в одному випадку свіжоізолюваною, в іншому – криоконсервованою суспензією МЕК. Показано, що в зоні хрящового дефекту при алотрансплантації як свіжоізолюваної, так і криоконсервованої суспензії МЕК спостерігається інтенсивне протікання біосинтетичних і проліферативних процесів, що приводить до структурної організації й утворенню молоді хондронної тканини. Цей факт дозволяє розглядати трансплантацію суспензій як перспективний метод лікування травматичних ушкоджень суглобного хряща.

Ключові слова: мезенхімальні ембріональні клітини, алогенна трансплантація, криоконсервування, репаративна регенерація.

The effect of freshly isolated and cryopreserved suspension of mesenchymal embryonic cells (MECs) on a reparative regeneration of rat's cartilage defect at allogenic transplantation was under study. The MECs, procured by enzymatic and mechanical desaggregation of rat's embryo tissue of 10-14 gestation day were selected as the initial material for comparative study of biological effect in the model of regenerating cartilaginous tissue. The viability of freshly isolated cell suspension made 94-96%, but for cryopreserved one that was no less than 50%. The collagen sponge, saturated with freshly isolated MECs suspension in one case, and cryopreserved one in another case, was applied for the cartilage defect plasty. It has been shown, that in the zone of cartilaginous defect at the allotransplantation of both freshly isolated and cryopreserved suspension of MECs, an intensive proceeding of biosynthetic and proliferative processes is observed, that results in a structural organisation and the young chondroid tissue formation. This fact permits to consider the transplantation as a perspective method for treating traumatic damages of articular cartilage.

Key words: mesenchymal embryonic cells, allogenic transplantation, cryopreservation, reparative regeneration.

Несмотря на многообразие способов лечения травматических повреждений суставного хряща и заболеваний, связанных с нарушением его целостности, проблема репаративной регенерации этой

In spite of the variety of methods for treating the articular cartilage traumatic damages and diseases, related to its integrity impairment, the problem of this tissue reparative regeneration has remained one of the

Адрес для корреспонденции: Ревенко Е.Б., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7721119, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Revenko E.B., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel: +38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ткани остается одной из важных в биологии и медицине. Для того, чтобы усилить репаративные процессы в суставном хряще при травмах и дистрофических изменениях, добиться его регенерации, используются различные способы хирургического лечения [3], лечения лекарственными препаратами (применение хондропротекторов и хондростимуляторов) [7], а также биологические и синтетические материалы для пластики зоны дефекта [9]. Однако вышеперечисленные способы лечения не всегда дают ожидаемый результат, в связи с чем продолжаются поиски путей стимуляции регенерации хрящевой ткани.

Согласно современным представлениям, восстановление хрящевой ткани во многом зависит от наличия в ней и активности стволовых клеток, способных к самообновлению и дифференцировке в различные типы зрелых клеток [8]. Мультипотентные мезенхимальные клетки являются предшественниками фибробластов, адипоцитов, остеоцитов и хондроцитов. Эти клетки присутствуют в хрящевой и костной ткани в малых количествах. При старении организма и при возрастных изменениях (остеопороз, остеоартрит) количество стволовых мезенхимальных клеток сохраняется, но их пролиферативная активность резко снижается [12]. Поэтому одним из перспективных методов репарации хрящевых дефектов с последующей регенерацией хряща может быть трансплантация в зону дефекта суспензий мезенхимальных клеток, полученных из эмбриональных тканей, которые являются наиболее богатым источником стволовых и коммитированных предшественников osteo- и хондрогенеза. Эти клетки характеризуются низкой иммуногенностью, высокой пластичностью и пролиферативным потенциалом. Кроме того, суспензии клеток, в отличие от более крупных биообъектов, могут быть криоконсервированы, что важно как с точки зрения накопления жизнеспособного материала, так и возможности полноценного обследования, гарантирующего его безопасное применение в клинике. Процесс криоконсервирования во многом определяет функциональную полноценность материала и соответственно успех трансплантации. Поэтому необходимо более детально изучить особенности криоконсервированного материала и эффективность его использования.

Известны попытки оптимизировать процессы регенерации суставного хряща путем использования мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из тканей взрослого организма – скелетогенной мышцы, надкостницы [11], однако широкого распространения эти подходы пока не получили.

important problems in biology and medicine. Different methods of surgical treatment [3], treatment with medicinal preparations (chondroprotectants and chondrostimulators) [7], as well as biological and synthetic materials for defect zone plasty [9] are used for strengthening the reparative processes in articular cartilage at the damages and dystrophic changes and for obtaining its regeneration. However the mentioned above methods are not always successful, so the search for new ways for stimulation of cartilage tissue's regeneration is in a progress.

According to the current notions, the recovery of cartilage tissue depends in a great extent on the presence and activity of stem cells in it, capable for self-renewal and differentiation into different types of mature cells [8].

Multipotent mesenchymal cells are progenitors of fibroblasts, adipocytes, osteocytes and chondrocytes. These cells are present in cartilaginous and bone tissue in a small amount. The number of stem mesenchymal cells is kept during an organism's ageing and at some age changes (osteoporosis, osteoarthritis), but there is a sharp decrease in their proliferative activity [12]. Therefore one of the perspective methods of cartilaginous defect reparation with following cartilage regeneration can be the transplantation into the defect zone of mesenchymal cell suspension, procured from embryonic tissues, being the richest source of stem committed progenitors of osteo- and chondrogenesis. These cells are characterised with a low immunogenicity, a high flexibility and a proliferative potential. In addition, the cell suspensions, in contrast to larger bioobjects, can be cryopreserved, that is important both from the point of view of the viable material accumulation and a possibility of integral examination, which guarantees its safe application in clinic. Cryopreservation process determines in many respects the material's functional integrity and, correspondingly, the transplantation success. Therefore there is the necessity of more detailed study of cryopreserved material peculiarities and its efficient application.

The attempts to optimise the processes of articular cartilage regeneration by using the mesenchymal stromal cells, isolated from tissues of adult organism: skeletogenous muscle, periosteum [11] are known, but these approaches have not been widely spread yet.

In the paper [2] there were described the transplantation results into the defect zone of rat's articular cartilage of the fragments and suspension of cryopreserved mesenchymal cells, obtained from human embryonic tissue. It was demonstrated, that at cell suspension xenotransplantation in comparison with tissue fragments there was the acceleration in the rates of reparative blastema formation.

The aim of this work was a comparative study of the effect of freshly isolated and cryopreserved MECs

В [2] были описаны результаты трансплантации в зону дефекта суставного хряща крыс фрагментов и суспензии криоконсервированных мезенхимальных клеток, полученных из эмбриональной ткани человека. Показано, что при ксенотрансплантации суспензии клеток по сравнению с тканевыми фрагментами ускоряются темпы формирования репаративной бластемы.

Цель данной работы – сравнительное изучение влияния свежeweделенных и криоконсервированных МЭК на процессы восстановления суставного хряща при аллотрансплантации крысам с дефектом коленного сустава.

Материалы и методы

Исходным материалом для сравнительного изучения биологического действия на модели регенерирующей хрящевой ткани были избраны МЭК, полученные путем мягкой ферментативной и последующей механической дезагрегации кожно-мышечной ткани эмбрионов крыс 10-14 дней гестации [1]. Жизнеспособность конечной клеточной суспензии, определяемая по включению трипанового синего [5], составляла 94-96%. Клеточную суспензию криоконсервировали в среде Хенкса под защитой 5%-го диметилсульфоксида по 3-этапной программе. Образцы размораживали непосредственно перед экспериментом на водяной бане при 38°C. Жизнеспособность деконсервированных клеток составляла не менее 50%.

Работа выполнена на 30 половозрелых самцах беспородных крыс, которым путем травматического повреждения смоделировали дефект коленного сустава: под наркозом производили артротомию коленного сустава, после чего в области межмышечковой борозды стоматологическим бором наносили остеохондральный дефект диаметром 2 мм и глубиной 2 мм. Затем животные были разделены на 3 экспериментальные группы: первую группу составляли животные, которым в область остеохондрального дефекта помещали фрагмент коллагеновой губки (контрольная группа); вторую – крысы, которым вводили в рану коллагеновую губку, пропитанную суспензией свежeweделенных МЭК. Для третьей группы животных пластическим материалом служила коллагеновая губка, пропитанная суспензией криоконсервированных МЭК. Рану коленного сустава ушивали шелком и животных помещали в стандартные условия вивария.

На 21-е сутки животных выводили из эксперимента. Материалом для гистологического исследования являлся коленный сустав, который был декальцинирован в 7%-м растворе азотной кислоты, приготовленном на 10%-м формалине, и дофиксирован в 10%-м водном растворе нейтраль-

on the processes of articular cartilage recovery at allotransplantation to rats with knee joint defect.

Materials and methods

The MECs, procured by mild enzymatic and following mechanical desaggregation of rat's embryo musculocutaneous tissue of 10-14 gestation day were chosen as the initial material for comparative study of biological effect in the model of regenerating cartilaginous tissue [1]. The viability of final cell suspension, determined by trypan blue inclusion [5] made 94-96%. Cell suspension was cryopreserved in Henks medium under 5% dimethyl sulfoxide protection by 3-stage program. The samples were frozen-thawed directly before the experiment on water bath at 37°C. The viability of frozen-thawed cells made not less than 50%.

The work was accomplished in 30 mature breedless male rats, to whom the knee joint defect was modelled by means of traumatic damage and under anesthesia the knee joint arthrotomy was carried-out, afterwards an osteochondral defect of 2mm in diameter and 2mm in depth was done with a dental drill into the intercondylar sulcus area. Then the animals were divided in 3 experimental groups: the first group comprised animals, to whom a fragment of collagen sponge was placed into the area of osteochondral defect (the control group); the second one: the rats, to whom the collagen sponge, saturated with freshly isolated MECs suspension, was introduced into the wound. The collagen sponge, saturated with cryopreserved MECs suspension served as a plastic material for the third group of animals. The knee joint wound was sutured with silk and the animals were placed under standard vivarium conditions.

To the 21st day the animals were taken out from the experiment. The material for histological study was the knee joint, decalcified in 7% solution of nitric acid, prepared in 10% formalin and fixed up in 10% aqueous solution of neutral formalin. After applying the alcohols with ascending concentration the material was placed in celloidin-paraffin mixture and the serial sections of 5-6 mcm thick were prepared. The reviewed preparations, stained with hematoxylin and eosin were used for total estimation of the studied tissue state. For a detailed study of connective-tissue structures the preparations were fuchsin-stained by Weigert's with micro-fuchsin staining up by Van Gieson's method. For estimating functional activity of regenerating tissues there were applied the Feulgen-Rossenbeck reaction, the staining by Brachet's method, PAS-reaction by MacManus Hotchkis and Hale's reaction [6].

Results and discussion

Initial wound of articular cartilage represented the defect, concerning not only all the zones of the

ного формалина. После проводки в спиртах возрастающей концентрации материал заключали в целлоидин-парафиновую смесь и готовили серийные срезы толщиной 5-6 мкм. Обзорные препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для общей оценки состояния исследуемых тканей. Для детального изучения соединительно-тканых структур препараты окрашивали фуксином по Вейгерту с докрасиванием пикрофусином по методу Ван Гизона. Для оценки функциональной активности регенерирующих тканей применяли реакцию Фельгена-Россенбека, окраску по методу Браше, ШИК-реакцию по Мак-Манусу Хочкису и реакцию Хейла [6].

Результаты и обсуждение

Исходная рана суставного хряща представляла собой дефект, затрагивающий не только все зоны самого хряща, но и субхондральную кость. По истечении срока наблюдения картина заживления суставного дефекта отличалась в зависимости от наличия и характера пластического материала.

В контрольной группе восстановление нарушенной целостности суставного хряща к 21-м суткам не наступило ни в одном из 10 наблюдений. Вблизи раневого дефекта отмечались участки истончения и поверхностной деструкции хряща, а также дистрофические изменения, которые проявлялись ослаблением базофилии основного вещества, кариопикнозом ядер хондроцитов и снижением, а в некоторых наблюдениях и полным отсутствием окрашивания ядер хрящевых клеток, что говорит о деконденсации ядерного хроматина. Имели место ослабление синевато-фиолетового окрашивания ядер при реакции Фельгена-Россенбека и слабая пиронинофилия цитоплазмы клеток при окраске Браше, что свидетельствует о снижении синтеза дезокси- и рибонуклеопро-теидов в ядрах клеток (рис.1).

В большинстве наблюдений отмечалось незаращение костной субхондральной пластинки с наличием некроза костных балок. На участке разрушенного хряща со стороны костномозговых пространств наблюдалось разрастание фибро-ретикулярной ткани (рис.2), а на границе поврежденного и неповрежденного хряща со стороны субхондральной кости – разрастание волокнистой соединительной ткани. В остальных случаях можно было наблюдать в разрастающейся фибро-ретикулярной ткани небольшие участки молодой незрелой хондроидной ткани, богатой недифференцированными мелкими округлыми клетками и малоразвитым слабобазофильным основным веществом, в котором обнаруживалось высокое содержание гликозаминогликанов (ГАГ), что в

cartilage itself, but subchondral bone as well. After the observation term expiry, the picture of articular defect healing was different depending on the presence and the character of plastic material.

To the 21st day in the control group there was no recovery of impaired integrity of articular cartilage in any of 10 observations. Close to the wound defect there were observed the sites of thickening and the cartilage surface destruction, as well as dystrophic changes, manifesting in basophilia weakening of the main substance, karyopyknosis of chondrocyte nuclei and a reduction, and even a complete absence in certain observations of staining in nuclei of cartilaginous cells, that testified to nuclear chromatin decondensation. There was the weakening of blue-violet staining of nuclei at Feulgen-Rossenbeck reaction and a weak pyroninophilia of cell cytoplasm at Brachet staining, that testified to a decrease in synthesis of desoxy- and ribonucleo-proteides in cell nuclei (Fig.1).

In the majority of observations there was noted the nonclosure of osseous subchondral plate with the presence of osseous beam necrosis. At the site of destroyed cartilage from the side of medullar spaces there was observed the growing up of fibroreticular tissue (Fig.2), but at the edge of damaged and non-damaged cartilage from the side of subchondral bone there was a growing up of fibrillar connective tissue. In the rest cases we could observe in a growing up fibroreticular tissue the small sites of young immature chondroid tissue, rich with non-differentiated small roundish cells and undeveloped slightly basophilic main substance, where a high content of glycosaminoglycans (GAG) was revealed, that in a whole testified to a weak proceeding of synthetic processes. The conducted investigations testify to the presence

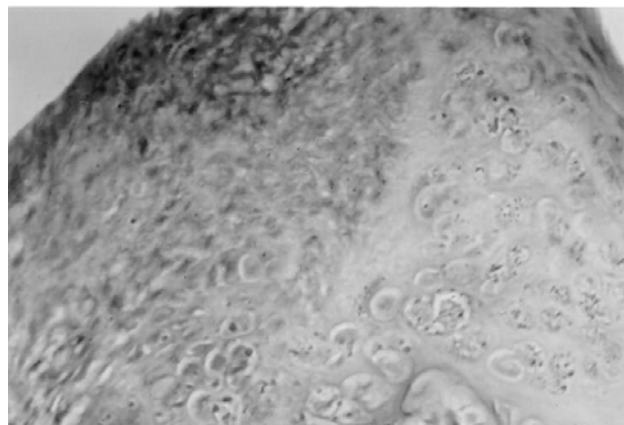


Рис.1. Дистрофические изменения вблизи зоны повреждения: ослабление базофилии основного вещества, снижение или полное отсутствие окрашивания ядер хрящевых клеток гематоксилином. Окраска гематоксилином и эозином (x 20).

Fig.1. Dystrophic changes close to the damage zone: weakening of main substance basophilia, a decrease or complete absence of hematoxylin staining of cartilaginous cell nuclei (x 20).

целом свидетельствует о слабом протекании синтетических процессов. Проведенные исследования свидетельствуют о наличии специфических элементов восстановления хондроидной ткани, недостаточных для полноценного замещения имеющегося дефекта.

Таким образом, через 3 недели после нанесения механической травмы и введения в рану коллагеновой губки происходит замещение дефекта хрящевой ткани в основном за счет фиброретикулярной и соединительной ткани. Ни в одном наблюдаемом случае не происходило смыкания краев раны и формирование хрящевой ткани.

Использование свежeweделенных МЭК (вторая группа) в сочетании с коллагеновой губкой для заполнения операционного дефекта хрящевой ткани приводило к частичному восстановлению хряща сращением краев хрящевой раны. При этом в зоне сращения имело место слияние матрикса предсуществовавшего и новообразованного хряща, а также образование молодого гиалинового хряща с клетками различной степени зрелости. На рис. 3 можно видеть недифференцированные мелкие округлые клетки и мало- и дифференцированные хондробласты и хондроциты. Дифференцированные хондробласты представляют собой клетки неправильной формы, различной величины с крупным светлым ядром. Хондроциты – крупные клетки округлой формы с небольшим объемом цитоплазмы и крупным овальным ядром. Среди этих клеток в большом количестве встречались гипертрофированные клеточные элементы, в которых ядерный хроматин при реакции Фельгена-Россенбека давал четкое окрашивание, а также наблюдалась интенсивная пиронинофилия цитоплазмы при реакции Браше. Межуточное вещество новообразованного хряща характеризовалось высокой активностью ГАГ (рис. 4). В участках, где

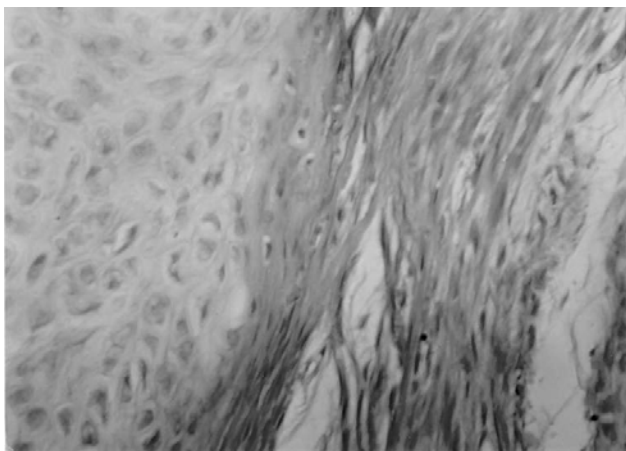


Рис. 3. Высокая активность ГАГ в основном веществе хряща. Окраска ШИК-Хейла (x 20).

Fig. 3. GAG high activity in cartilage main substance. PAS-Hale staining (x 20).

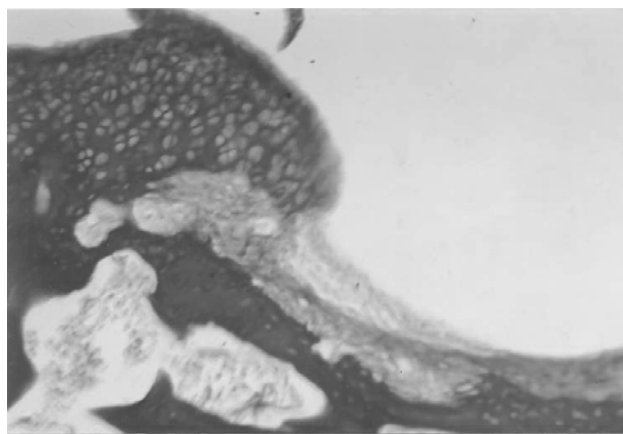


Рис. 2. Разрастание фиброретикулярной ткани со стороны костномозговых пространств хряща. Окраска по Ван Гизону (x 20).

Fig. 2. Growing up of fibroreticular tissue from the side of medullar spaces of cartilage. Staining by Van Gieson (x 20).

of specific elements of chondroid tissue recovery, insufficient for the defect integral substitution.

Thus, 3 weeks after the causing of mechanical trauma and introducing a collagen sponge into the wound, the substitution of cartilaginous tissue defect occurs mainly due to the fibroreticular and connective tissues. No cases of wound edge closure and the cartilaginous tissue formation were observed.

The usage of freshly isolated MECs (the second group) combined with collagen sponge for filling up the operation defect of cartilaginous tissue resulted in a partial recovery of cartilage in the form of the cartilaginous wound edge closure. At this time in the closure area there was a fusion of matrix of pre-existing and newly formed cartilage, as well as the formation of young hyaline cartilage with cells of different maturity degree. The Fig. 3 shows the nondifferentiated small roundish cells and slightly- and differentiated chondroblasts and chondrocytes. Differentiated chondroblasts represent the cells of irregular shape, of different size with large light nucleus. Chondrocytes are large cells of roundish shape with small volume of cytoplasm and large oval nucleus. Among these cells a big number of hypertrophied cellular elements was found, where nuclear chromatin at the Feulgen-Rossenbeck reaction was distinctly stained, as well as an intensive pyroninophilia at the Brachet's reaction was observed. An interstitial substance of a newly formed cartilage was characterised with the GAG high activity (Fig. 4). In the sites, where the fissure between the cartilaginous wound edges was kept, there were observed a narrow zone of fibrillar tissue with elements of fibrillar cartilage and young connective tissue with chondroid differentiation signs. Close to the wound in the undamaged sites of cartilage there were the groups of proliferating cartilaginous cells, rounded with capsules. In these cells there was histochemically noted a high content of ribonucleoproteids (RNP),

сохранялась щель между краями хрящевой раны, отмечалась узкая зона волокнистой ткани с элементами волокнистого хряща и молодой соединительной ткани с признаками хондроидной дифференцировки. Вблизи раны в неповрежденных участках хряща имели место группы пролиферирующих хрящевых клеток, окруженных капсулами. В этих клетках гистохимически было отмечено высокое содержание рибонуклеопротеидов (РНП), определяемых реакцией Браше и дезоксинуклеопротеидов (ДНП), обнаруживаемых с помощью реакции Фельгена-Россенбека, что свидетельствует об интенсивной репарации хрящевой ткани. Кроме того, обращало внимание и восстановление поврежденных костных структур: в подлежащей субхондральной зоне имела новообразованная кость губчатого строения, а в ряде наблюдений прослеживалась тенденция к формированию костной пластинки. Все вышеперечисленное говорит о том, что в месте дефекта интенсивно протекали биосинтетические процессы (увеличение содержания ГАГ), наблюдались пролиферация и миграция клеточных элементов, а также увеличение площади основного вещества, что характеризовало высокую репарационную способность и разрастание новообразованной хондроидной ткани и костных структур. В большинстве случаев отмечалась органотипическая регенерация гиалинового хряща с образованием участков молодой хондроидной ткани.

Гистологические исследования раневого дефекта у животных, которым в зону механической травмы суставного хряща вводили коллагеновую губку с криоконсервированными МЭК (третья группа), показали, что к окончанию эксперимента хрящевой дефект был заполнен регенератом, представленным незрелой хондроидной тканью или незрелым гиалиновым хрящом, причем полное сращение краев дефекта хряща обнаруживалось только в одной трети наблюдений. По ходу сращения краев раны хряща происходило слияние матрикса и просматривалась узкая зона недифференцированных соединительно-тканых элементов, среди которых обнаруживались островки ткани, дифференцирующейся в направлении хондрогенеза. В этих местах отмечены скопления хрящевых клеток, имеющих различную величину, и среди них – в большом количестве гипертрофированные клеточные элементы. Структурная зональность новообразованного хряща не была четко выражена. При введении криоконсервированных МЭК наблюдалась очаговая пролиферация хондроцитов на границе с неповрежденным хрящом, что подтверждается усилением окраски ядерных структур (ДНП, РНП) и высокой

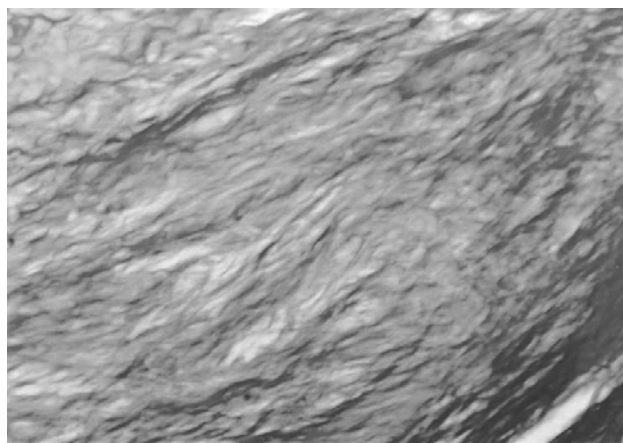


Рис. 4. Образование клеток и ткани с признаками хондроидной дифференцировки. Окраска гематоксилином и эозином (x 20).

Fig. 4. Formation of cells and tissue with chondroid differentiation signs. Staining with hematoxylin and eosin (x 20).

determined by Brachet's reaction and deoxynucleoproteids (DNP), revealed using Feulgen-Rossenbeck reaction, that testified to an intensive reparation of cartilaginous tissue. In addition, the recovery of damaged bone structures attracted the attention as well: in the underlying subchondral zone there was a newly formed bone of spongy structure, and in some observations the tendency to the bone plate formation was traced. All this testifies to the fact, that in the defect place there was an intensive proceeding of biosynthetic processes (increase in GAG content), there were observed the proliferation and migration of cell elements, as well as an increase in the main substance surface, that characterised a high reparative capability and the growing up of a newly formed chondroid tissue and bone structures. Organ-specific regeneration of hyaline cartilage with formation of young chondroid tissue sites was noted in the majority of cases.

Histological investigations of wound defect in animals, to whom a collagen sponge with cryopreserved MECs (the third group) was introduced into the zone of mechanical trauma of articular cartilage, demonstrated, that to the end of the experiment the cartilaginous defect was filled with the regenerate, presented by immature chondroid tissue or immature hyaline cartilage, moreover a complete closure of the cartilage defect edges was found out only in the one third of the observations. Along the edges closure of cartilage wound there was occurred the matrix fusion and it was seen a narrow zone of non-differentiated connective elements, among which the islets of tissue, differentiating into the chondrogenesis direction were found out. The accumulations of cartilaginous cells with different size, and among them a huge number of hypertrophied cell elements were noted in these places. Structural zoning of newly formed cartilage was not

активностью ГАГ, дающих при реакции Хейла интенсивное голубое окрашивание.

В некоторых случаях при использовании криоконсервированного материала в ране обнаруживался регенерат, представляющий собой фиброретикулярную или грануляционную ткань, заполняющую зону дефекта со стороны субхондральной кости, в целом раневой дефект был представлен волокнистой хрящевой тканью. Таким образом, при применении криоконсервированных МЭК закрытие дефекта хряща в течение срока наблюдения происходит медленнее и менее полно, чем при использовании свежесыведенных клеток: только в одной трети наблюдений установлены полное сращение краев раны и формирование незрелого гиалинового хряща. В остальных случаях отмечено образование волокнистого хряща.

Следовательно, аллогенная трансплантация как свежесыведенной, так и криоконсервированной суспензии МЭК стимулирует репаративную регенерацию хондроидной ткани. Можно предположить, что пластика зоны дефекта хряща коллагеновой губкой, заполненной клеточной суспензией, обеспечивает инициацию хондрогенеза, причем восстановление хрящевой ткани наблюдается как с краев зоны дефекта, так и из области субхондральной зоны – из мест локализации камбиальных клеточных элементов.

Механизмы стимуляции регенерации хондроидной ткани после трансплантации свежесыведенных и криоконсервированных МЭК остаются невыясненными вследствие сложности определения роли введенных в зону травмы сустава клеток. Вполне реальными представляются интеграция МЭК в систему хондрогенеза реципиента и выполнение ими специальных функций за счет пролиферации и дифференцировки стволовых и коммитированных клеток в хондроциты [13].

Отдельным стимулом репаративной регенерации хряща могут выступать ростовые факторы, интерлейкины, хемокины и другие биологически активные вещества, вырабатываемые эмбриональными клетками [10]. Длительное действие ростовых факторов в зоне дефекта способно индуцировать остео- и хондрогенез и соответственно образование хрящевой ткани, необходимым для его заполнения.

Выводы

Проведенные исследования показали, что этап криоконсервирования МЭК оказывает существенное влияние на процессы репаративной регенерации хрящевой ткани при трансплантации. При использовании криоконсервированных МЭК регенерация хондроидной ткани происходит

clearly defined. When introducing cryopreserved MECs the focal proliferation of chondrocytes at the edge with non-damaged cartilage was observed, that was confirmed by the strengthening of nuclear structure staining (DNP, RNP) and the GAG high activity, giving an intensive blue staining at Hale's reaction.

In some cases when using cryopreserved material in the wound there was found out the regenerate, representing fibroreticular or granular tissue, filling the defect zone to the side of subchondral bone, in the whole the wound defect was represented by fibrillar cartilaginous tissue. Thus, when applying cryopreserved MECs the closure of cartilage defect during the observation term occurs slower and less completely, than when using freshly isolated cells: only in one third of observations there were established a complete closure of wound edges and the immature hyaline cartilage formation. The fibrillar cartilage formation was noted in the rest of cases.

Consequently, the allogeneic transplantation of both freshly isolated and cryopreserved MECs suspension stimulates reparative regeneration of chondroid tissue. It can be assumed, that the cartilage defect zone plasty with collagen sponge, filled with cellular suspension, provides the chondrogenesis initiation, moreover the recovery of cartilaginous tissue is observed both on the edges of defect zone and in the subchondral zone area: in the places of cambial cell element localisation.

Mechanisms for stimulating chondroid tissue regeneration after transplantation of freshly isolated and cryopreserved MECs have remained unclear due the difficulty with determining the role of cells, introduced into the zone of cartilage trauma. The integration of MECs into a recipient's chondrogenesis system and their realisation of special functions due to the proliferation and differentiation of stem and committed cells into chondrocytes seem to be quite real [13].

The growth factors, interleukines, chemokines and other biologically active substances, produced by embryonic cells can act as some stimulus for reparative regeneration of cartilage [10]. A long-term effect of growth factors in the defect zone is capable to induce osteo- and chondrogenesis and, correspondingly, the cartilaginous tissue formation, essential for its filling up.

Conclusions

The conducted investigations demonstrated, that the stage of MECs cryopreservation considerably affected the processes of reparative regeneration of cartilaginous tissue during transplantation. When using the cryopreserved MECs the regeneration of chondroid tissue proceeds more slowly. This can be related to the fact, that the integral functioning of the MECs

медленнее. Это может быть связано с тем, что полноценное функционирование деконсервированного трансплантата МЭК возможно только после его адаптации к условиям нормотермии, время которой может исчисляться несколькими сутками [4]. Другим обстоятельством, влияющим на активность криоконсервированных МЭК при трансплантации, может явиться адекватность применяющегося метода криоконсервирования: суспензия МЭК является поликомпонентной клеточной системой, отдельные элементы которой, очевидно, по-разному реагируют на действие факторов низкотемпературного криоконсервирования. Это приводит к снижению общего числа жизнеспособных клеток. Также не исключено, что в результате криоконсервирования происходит селекция входящих в суспензию типов клеток, опосредованные результаты которой проявляются в снижении темпа репаративной регенерации хрящевого дефекта. Тот факт, что эффективность трансплантации зависит от количества жизнеспособных клеток в суспензии (в свежесыводенных препаратах МЭК жизнеспособность достоверно выше, чем в криоконсервированных), косвенно свидетельствует в пользу непосредственного участия стволовых клеток в процессе регенерации хряща.

Стимуляция восстановительных процессов в области механической травмы хряща под влиянием суспензии свежесыводенных и криоконсервированных МЭК позволяет рассматривать трансплантацию этой суспензии, представленной стволовыми эмбриональными клетками, как перспективный метод лечения травматических повреждений суставного хряща.

Литература

1. Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии.– М.: Медицина, 1976.– С. 41-43.
2. Грищенко В.И., Петренко А.Ю., Жигун А.И и др. Влияние трансплантации криоконсервированных мезенхимальных клеток эмбрионов человека на процессы регенерации при травматическом повреждении суставного хряща крыс // Пробл. криобиологии.– 2001.– № 2.– С. 106-107.
3. Корж А.А., Черных В.П., Филиппенко В.А. и др. Диагностика и консервативное лечение заболеваний и повреждений опорно-двигательной системы: Справочник: Кн. 2. Остеоартроз.– Харьков: Основа, 1997.– 88 с.
4. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
5. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фрешни.– М.: Мир, 1989.– 333 с.
6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия.– М.: Мир, 1969.– 624 с.
7. Лобенко О.О., Корж М.О., Дедух Н.В. Остеоартроз. Консервативна терапія.– Харків: Прапор, 1999.– 336 с.
8. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология.– М.: БЭБиМ, 1998.– 199 с.

frozen-thawed transplant is possible only after its adaptation to normothermic conditions, the time of which may be considered in term of days [4]. Another circumstance, affecting the activity of cryopreserved MECs at transplantation can be the adequacy of the applied method of cryopreservation: MECs suspension is the poly-component cell system, which separate elements evidently respond in a different way to the effect of low temperature preservation. This results in a decrease of total number of viable cells. It could not be excluded that as a result of cryopreservation the selection of cell types, being a part of suspension occurs, which mediated results are manifested in a rate decrease in reparative regeneration of cartilaginous defect. The fact, that the transplantation efficiency depends on a number of viable cells in a suspension (in freshly isolated MECs preparations the viability is statistically higher, than in the cryopreserved ones), indirectly testifies in favour of immediate participation of stem cells in the cartilage regeneration process.

The stimulation of recovery processes in the site of cartilage mechanical trauma under the effect of freshly isolated and cryopreserved MECs suspension allows the considering of this suspension transplantation, represented by stem embryonic cells, as a perspective method for treating traumatic damages of articular cartilage.

References

1. Golubev D.B., Sominina A.A., Medvedeva M.N. Manual for cell culture application in virology.– Moscow: Meditsina, 1976.– P. 41-43.
2. Grischenko V.I., Petrenko A.Yu., Zhigun A.I. et al. Transplantation effect of human embryo cryopreserved mesenchymal cells on the regeneration processes at a traumatic damage of rat's articular cartilage // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2.– P. 106-107.
3. Korzh A.A., Chernykh V.P., Filippenko V.A. et al. Diagnostics and conservative treatment of diseases and damages of locomotor system: Reference book. Book 2. Osteoarthritis.– Kharkov: Osнова, 1997.– 88 p.
4. Cryopreservation of cell suspensions / Edited by A.A. Tsutsayeva.– Kiev: Naukova Dumka, 1983.– 240 p.
5. Culture of animal cells. Methods / Ed. by R. Freshni.– Moscow: Mir, 1989.– 333 p.
6. Lilli R. Pathohistological techniques and practical histochemistry.– Moscow: Mir, 1969.– 624 p.
7. Lobenko O.O., Korzh M.O., Dedukh N.V. Osteoarthritis. Conservative therapy.– Kharkiv: Prapor, 1999.– 336 p.
8. Repin V.S., Sukhikh G.T. Medical cellular biology.– M.: Bulletin eksperimentalnoj biologii i meditsiny, 1998.– 199 p.
9. Brittberg M. Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects. Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects. Ed. by Reginster J.Y.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999.– P. 431-453.
10. Hayneswerth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cell surface antigens human marrow-derived mesenchymal cells A// Bone.– 1992.– Vol.13.– P. 69-80.

9. *Brittberg M.* Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects Ed. by Reginster J. Y.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999.– P. 431-453.
10. *Hayneswerth S.E., Baber M.A., Caplan A.I.* // Cell surface antigens human marrow-derived mesenchymal cells A // Bone.– 1992.– Vol.13.– P. 69-80.
11. *Minas T., Nehrer S.* Current concepts in the treatment of articular cartilage defects// Orthopedics.– 1997.– P. 431-453.
12. *Oreffo R.O.C., Bord S., Triffit J. T.* Skeletal progenitor cells and ageing human population // Clin. Sci.– 1988.– N4.– P. 549-555.

Accepted in 22.10.2002

Поступила 22.10.2002