



ВОЗМОЖНОСТЬ ПРЕВЕНТИВНОЙ КОРРЕКЦИИ ДИСТРОФИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ МЕЖПОЗВОНКОВЫХ ДИСКОВ МЕТОДОМ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

А.М. Зайдман, И.Ю. Ким, А.В. Корель, С.П. Маркин
Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии

Цель исследования. Анализ возможности трансплантации культивированных хондробластов в пульпозное ядро интактного межпозвонкового диска (МПД) как предпосылки коррекции структурно-функциональных нарушений на ранних стадиях остеохондроза.

Материалы и методы. Хондробласты, выделенные из позвоночника новорожденных щенков дикого типа, подвергались культивированию в соответствующих средах. Трансплантация хондробластов II пассажа осуществлялась в МПД взрослым собакам дикого типа. Препараты извлекались в сроки 14 дней, 1, 3, 6 мес. и исследовались методами биохимии, углубленной морфогистохимии, ультраструктурного анализа. Экспрессию гена агрекана в трансплантате исследовали методом полимеразно-цепной реакции.

Результаты. Хондробласты II пассажа, трансплантированные в МПД, реализуют свою генетическую программу в несколько этапов. В течение первых двух недель наблюдается адаптация хондробластов к метаболическим условиям *in vivo*. При этом процесс функционирования клеток осуществляется путем ауто- и паракриной регуляции, а клетки находятся в стационарном состоянии. На втором этапе наблюдаются активизация синтетических и митотических процессов, формирование внеклеточного матрикса и усложнение ультраструктурной организации хондробластов. На третьем этапе регистрируются изогенные группы, колонковые структуры, хондронная организация, что свидетельствует о включении многоуровневой регуляции функционирования клеток, которая обеспечивает формирование органоспецифичного гиалинового хряща.

Заключение. Хондробласты, трансплантированные в соответствующую метаболическую среду, подвергаются многоуровневой эволюционно закрепленной регуляции, в результате формируется специфический гиалиновый хрящ, способный обеспечить структурно-функциональную целостность МПД.

Ключевые слова: хондробласты, трансплантация, протеогликаны.

POSSIBILITY OF PREVENTIVE CORRECTION OF DYSTROPHIC CHANGES IN INTERVERTEBRAL DISC BY CELL ENGINEERING TECHNIQUE
A.M. Zaidman, I.Yu. Kim, A.V. Korel, S.P. Markin

Objective. To study a possibility of cultured chondroblast transplantation into nucleus pulposus of the intact intervertebral disc for correction of structural-functional disorders at early stages of degeneration.

Material and Methods. Chondroblasts isolated from the spine of newborn wild-type puppies were cultured in appropriate media. Second passage chondroblasts were transplanted into intervertebral disc of wild-type mature dogs. Specimens were extracted at 14 days, 1, 3, and 6 months and studied using biochemical, in-depth morphohistochemical, and ultrastructural analyses. Aggrecan gene expression in a transplant was analyzed by a polymerase chain reaction.

Results. Second-passage chondroblasts transplanted into intervertebral disc realize their genetic program in several steps. During first two weeks an adaptation of chondroblasts to metabolic conditions *in vivo* is observed. The process of cell functioning consists in auto- and paracrine regulation, and cells are under steady-state condition. The second stage includes activation of synthetic and mitotic processes, formation of extracellular matrix, and amplification of the ultrastructural organization of chondroblasts. At the third stage isogene groups, columnar structures, and chondronic organization are registered. This testifies to multilevel organization of cell functioning providing a formation of organospecific hyaline cartilage.

Conclusion. Chondroblasts transplanted into appropriate metabolic medium are subjected to multilevel evolutionary fixed regulation resulting in formation of specific hyaline cartilage which can facilitate structural-functional integrity of the intervertebral disc.

Key Words: chondroblasts, transplantation, proteoglycans.

Hir. Pozvonoc. 2007;(3):65–73.

Во многих ситуациях поменять больные клетки на здоровые становится более эффективным способом, чем лечить старые и больные.

А.В. Соболев

Введение

Межпозвоночный диск (МПД) человека – одна из самых больших аваскулярных структур организма. Кровеносные сосуды локализуются в передней продольной связке и только на 1/3 перфорируют фиброзное кольцо (ФК). Некоторые клетки удалены от ближайших сосудов на 20 мм [16]. Диффузия метаболитов осуществляется через прослойки рыхловолокнистой части диска, расположенной между плотными коллагеновыми волокнами. Ограничивает диск аваскулярная замыкательная пластинка, представленная хрящевой тканью и хондроцитами, которые не репродуцируются. Со стороны костной ткани капиллярные сети образуют петли, в связи с чем пенетрации капиллярами хрящевой ткани не происходит [2, 17]. Сосудистые петли – базальная мембрана, околососудистое пространство и протеогликаны (ПГ), синтезируемые хондроцитами замыкательной пластинки, – являются своеобразным барьером, обеспечивающим гомеостаз структурных компонентов диска [2].

Важнейшей функцией МПД является гашение постоянных или ударных нагрузок и колебательных движений [15]. МПД представляет собой структуру, которая равномерно распределяет нагрузки по поверхности смежных позвонков [1, 9, 14, 15]. Воздействуя на позвоночник в целом, биомеханические нагрузки концентрируются в МПД и равномерно распределяются на костные структуры позвоночного столба [20].

Уникальное сочетание выполняемых функций становится возможным при соответствующей морфологической и биохимической структуре МПД [3, 5, 11, 12].

Вместе с тем структурно-функциональные особенности МПД, аваскулярность и прямохождение являются

предпосылками метаболических нарушений и последующих патологических изменений в нем. Процесс фибротизации прослоек рыхловолокнистой соединительной ткани усугубляет процесс диффузии метаболитов к хондроцитам внутренних порций диска. В условиях дефицита метаболитов нарушается синтез ПГ, снижается количество хондроитинсульфатных цепей ПГ, падает гидратация пульпозного ядра (ПЯ), что приводит к фрагментации последнего. Метаболические изменения являются причиной нарушения целостности ФК и пролабирования ПЯ с последующим формированием грыж диска. На фоне снижения высоты МПД развиваются неврологический конфликт и болевой синдром. Восстановление структурной целостности МПД, предотвращение фибротизации, а следовательно, и коллабирования диска, создание упругой амортизирующей структуры, обеспечивающей синтез ПГ и циркуляцию метаболитов, – все это позволит нормализовать функционирование МПД.

Цель работы – исследование возможности трансплантации культивированных хондробластов в ПЯ интактного МПД как предпосылки коррекции структурно-функциональных нарушений на ранних стадиях остеохондроза.

Материал и методы

Материалом для культивирования служили хондробласты, которые извлекались в стерильных условиях из позвоночника новорожденных щенков дикого типа. Гиалиновый хрящ отмывали в растворе Хенкса с канамицином 1 г/л в течение 15 мин, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI до размеров 1–2 мм², а затем помещали в раствор 1,5 % коллагеназы в силиконизированной посуде для

инкубирования на шейкере при температуре 37 °С в течение 5–8 ч. Суспензию пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Далее клетки ресуспендировали в ростовой питательной среде. Полученную популяцию клеток культивировали в культуральных флаконах в концентрации 3×10^5 клеток на мл в среде ДМЕМ/F12 1:1 (Gibco) с добавлением 20 % фетальной сыворотки крови плодов коровы при 37 °С. Пересев хондробластов осуществлялся два раза в неделю с кратностью посева 1/2–3. Смену среды проводили каждые три дня. После механического измельчения, а затем обработки в 1,5 % растворе коллагеназы суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр, центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин и помещали для ресуспендирования в ростовую среду ДМЕМ. Культивирование клеток проводили в питательной среде ДМЕМ с добавлением 20 % FBS.

Для трансплантации использовались хондробласты II пассажа [4]. Трансплантация клеток в МПД 5-летним собакам осуществлялась под 5 % кетаминным наркозом с предварительной премедикацией. Внебрюшинным доступом обнажался поясничный отдел позвоночника и толстой иглой в межпозвоночные ПЯ дисков L₂–L₃, L₃–L₄, L₄–L₅ вводилось 5 млн хондробластов. Рана послойно ушивалась наглухо. Животные выводились из эксперимента через 2 недели, 1, 3, 6 мес. Из позвоночника извлекались МПД. Материал фиксировался в 10 % растворе формалина и подвергался машинной проводке, готовились срезы, которые окрашивались гистологическими методами (гематоксилин-эозином по Ван-Гизону и Маллори), гистохимическими методами (толуидиновым синим при разных значениях pH, альциановой синью, Хейл-реакцией, Шик-реакцией,

реакциями Грина, Сидидмена). Ко всем реакциям ставились соответствующие контроли. Окислительно-восстановительные ферменты определялись на креостатных срезах реакцией Нади и Нахласа. Определение пролиферативной активности клеток осуществлялось иммуногистохимической реакцией с PSNA-маркером пролиферации. Для проведения ультраструктурных исследований материал фиксировался в 4 % растворе параформа, дофиксировался в 1 % растворе OsO₄, обезжизивался в спиртах возрастающей концентрации, заключался в эпон-аралдит. На ультратоме LKB готовились ультратонкие срезы, контрастировались уранилацетатом и просматривались под электронным микроскопом.

Измерение диаметров и площадей клеток, вычисление ядерно-цитоплазматических отношений и статистическая обработка полученных результатов осуществлялись при помощи пакета программ «Morpho Images».

На I, II, III пассажах среды, полученные от клеточных культур, забирали для проведения биохимического исследования. Были определены качественный и количественный состав гликозаминогликанов (ГАГ). ГАГ из сред выделялись следующим образом. Белки осаждали добавлением к образцам 100 % ТХУ до конечной концентрации 5 %, центрифугировали, затем раствор диализовали против 50 мМ Na-ацетатного буфера pH-5,8 в течение 18 ч при температуре 4 °С. ПГ осаждали тремя объемами 96 % этанола с 4 % К-ацетатом с последующим центрифугированием, осадки растворяли в деионизованной воде.

Качественный состав ГАГ в средах II пассажа хондроцитов исследовался методом разделения электрофорезом в 1 % геле агарозы [19], в 50 мМ буфере ацетата бария с pH 5,0. Исследуемые образцы ГАГ перед электрофорезом последовательно обрабатывали хондроитиназами АС, АВС, кератаназой в 50 мМ трис-буфере pH 7,5 18 ч при 37 °С для удаления отдельных видов ГАГ. После окончания процедуры

гель окрашивали 0,1 % азуром с 50 мМ натрий-формиатом и 10 мМ хлоридом магния с pH 3,5. Окрашенный гель отмывали 50 мМ ацетатным буфером с pH 5,8. Для идентификации ГАГ были использованы метчики – хондроитинсульфаты А, В, С, кератансульфат и гепарансульфат.

Количество ГАГ определяли по присутствию гексуроновых кислот [8] и сульфатированных ГАГ [10], гексозы (ацетилированные и неацетилированные гексозамины) определяли после гидролиза образцов в 0,5 Н соляной кислоте (при 100 °С 30 мин). Результаты представлены в виде микрограммов на 100 микролитров среды. Отношение количеств ГАГ, определяемых по гексуроновым кислотам и по количеству сульфатированных групп, считали показателем степени сульфатированности. В качестве стандарта использовали хондроитинсульфат С.

Материалом для исследования уровня экспрессии генов-кандидатов служили хондробласты, извлеченные в стерильных условиях из позвоночника новорожденных щенков дикого типа. Гиалиновый хрящ отмывали в растворе Хенкса с канамицином 1 г/л в течение 15 мин, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI до размеров 1–2 мм², а затем помещали в раствор 1,5 % коллагеназы в силиконизированной посуде для инкубирования на шейкере при температуре 37 °С в течение 5–8 ч. Суспензию пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Далее клетки ресуспендировали в ростовой питательной среде. Полученную популяцию клеток культивировали в культуральных флаконах в концентрации 3 x 10⁵ клеток на мл в среде ДМЕМ/F12 1:1 (Gibco) с добавлением 20 % фетальной сыворотки крови плодов коровы при 37 °С. Пересев хондробластов осуществлялся два раза в неделю с кратностью посева 1/2–3. Смену среды проводили каждые три дня. Для дальнейших исследований использовались хондробласты II пассажа.

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовались праймеры «Медиген». Праймеры подбирали для гена агрекана человека (NM013227, GI:6995993), GAPDH (NM_002046.2, GI:7669491). Выделение и РНК из хондробластов осуществлялось китом TRIZOL.

Для очистки РНК от ДНК добавляли к 40 мкл выделенного РНК-раствора 1 ед. активности ДНК-азы и соответствующий буфер, доводили до объема 100 мкл. Инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Добавляли 100 мкл фенола, перемешивали. Добавляли 40 мкл хлороформа, центрифугировали 5 мин при 7,5 тыс. g. Переносили водную фазу в чистую пробирку, добавляли 100 мкл изопропанола. Инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 12 тыс. g в течение 10 мин. Образовавшийся осадок промывали 200 мкл 75 % этилового спирта и центрифугировали 7,5 g в течение 5 мин. Высушивали осадок, растворяли в 40 мкл воды и инкубировали при 55 °С в течение 10 мин.

Для проведения обратной транскрипции к 2 мкг выделенной РНК добавляли 10 пмоль праймеров (OligodT или случайные гексануклеотидные праймеры), инкубировали 5 мин при 70 °С, охлаждали на льду в течение 1 мин, встряхивали. Далее добавляли в строгой последовательности 5 мкл буфера для обратной транскрипции, 0,5 ммоль каждого дезокси-нуклеозидтрифосфата, 200 ед. активности обратной транскриптазы M-MTLV, доводили водой до 25 мкл. Инкубировали 1 ч при 37 °С.

Аmplификацию фрагментов генов агрекана, GAPDH проводили методом мультиплексной ПЦР на амплификаторе Терцик. В качестве контрольного гена использовался ген GAPDH. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, с добавлением ~200 нг кДНК, 2 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (10 мМ Tris-HCl, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, pH 8,3), 20 пмоль каждого праймера, 0,2 мМ каждого дезокси-нуклеозидтрифосфата и 1 ед. активности Taq-ДНК-полимеразы. Реакционную

смесь покрывали равным объемом минерального масла. ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при 95 °С, далее 32 цикла при денатурации 30 с при 95 °С, отжиге праймеров 30 с при 55 °С, элонгации 60 с при 72 °С, 10 мин при 72 °С.

Анализ продуктов ПЦР проводили методом горизонтального гель-электрофореза в 0,9 % агарозном геле в буфере TAE (0,04 М Tris-HCl; 0,05 М EDTA, pH 8,0) с содержанием 1 мкг/мл бромистого этидия. Проводили электрофорез в течение 20 мин. Напряженность электрического поля 6–8 В/см. Для нанесения на гель раствор ДНК смешивали с 50 % глицерином, содержащим 0,1 % бромфенолового синь, 0,1 % ксиленианол в соотношении 1:10. Сканирование геля проводили в ультрафиолетовом свете с помощью видеосистемы «DNA Analyzer». В качестве стандарта молекулярной массы использовали ДНК плазмиды pBlueScript/SK, обработанную эндонуклеазой рестрикции MspI, маркерную ДНК 100 bp и 1 kb.

Результаты

Выбор хондробластов разных пассажей осуществлялся на основе их синтетических потенций и фенотипических признаков. Как показали исследования (табл., рис. 1), хондробласты II пассажа по своим морфологическим показателям соответствуют фенотипу хондробластов внутренних порций МПД, осуществляют синтез хондроитинсульфата А и С и в следовых количествах кератансульфата (рис. 2), экспрессируют ген агрекана (рис. 3).

Через две недели после трансплантации в центре ПЯ располагается группа хондробластов в виде колоний (рис. 4). Клетки контактируют между собой при помощи отростков, что напоминает формирование колоний *in vitro*. Вокруг клеток и в цитоплазме выявляются хондроитинсульфаты А и С. Вокруг клеточных колоний в ПЯ сохраняется окраска на хондроитинсульфаты.

В центре ПЯ морфологическими методами по степени дифференцировки идентифицируется три типа клеток: низко-, средне- и высокодифференцированные хондробласты (рис. 5). Преобладающими являются средне- и высокодифференцированные хондробласты с соответствующими морфологическими показателями. Клетки I типа (рис. 6) овальной формы с площадью 60,90 мкм. Ядро круглое с преимущественным содержанием гетерохроматина. Цитоплаз-

ма клеток базофильна, в ней выявляются хондроитинсульфаты и мелкие гранулы гликогена (рис. 7). Гранулы СДГ и НАД-Н-диафоразы определяются преимущественно в околоядерной зоне. Вокруг клеток определяется бледная реакция на сульфатированные ГАГ. Плазматическая мембрана с незначительными отростками, ядро овальной формы и занимает значительный объем цитоплазмы, контуры ядерной мембраны неровные (рис. 8), с инвагинатами, матрикс ядра имеет

Таблица

Количественный состав гликозаминогликанов в средах I–III пассажей хондробластов позвоночника новорожденного щенка

Пассаж	S-ГАГ*	УК*	S-ГАГ/УК	Гал-за*	УК/Гал-за
I	5,646 ± 0,452	4,129 ± 0,248	1,367	1,535 ± 0,139	2,690
II	7,629 ± 0,611	5,074 ± 0,305	0,665	1,517 ± 0,137	3,345
III	10,390 ± 0,832	6,994 ± 0,420	1,485	1,692 ± 0,153	4,132

S-ГАГ — сульфатированные гликозаминогликаны (ГАГ); УК — уронеовые кислоты; S-ГАГ/УК — отношение количества сульфатированных ГАГ к количеству УК; Гал-за — галактоза; УК/Гал-за — отношение количества УК к количеству Гал-за;

* количественный состав ГАГ в микрограммах на 100 микролитров.

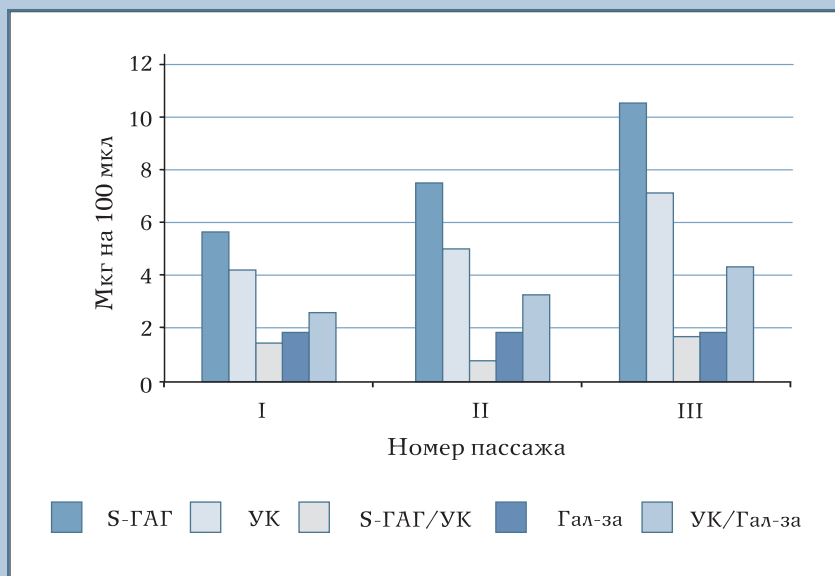


Рис. 1

Количественный состав гликозаминогликанов в средах I–III пассажей хондробластов позвоночника новорожденного щенка: S-ГАГ, УК, S-ГАГ/УК, Гал-за, УК/Гал-за — см. прим. к табл.

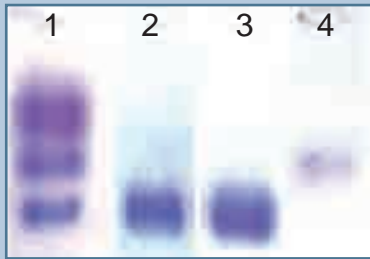


Рис. 2
 Фореграмма образцов гликозаминогликанов в средах культуры хондробластов (II пассаж); 1 – стандарт; 2 – нативный образец; 3, 4 – образцы, обработанные хондроитиназой АС и кератаназой соответственно



Рис. 3
 Результат мультиплексной ПЦР с праймерами для гена GAPDH (нижняя полоса) и гена агрекана (верхняя полоса): 1 – маркер; 2, 3, 4 – культивированные хондробласты позвоночника новорожденного щенка I, II, III пассажей соответственно



Рис. 4
 Через 1 неделю после трансплантации в межпозвонковый диск; клетки формируют колонии; окраска гематоксилин-эозином, 10 x 20



Рис. 5
 Клетки трех типов, трансплантированные в пульпозное ядро межпозвонкового диска; окраска гематоксин-эозином, 10 x 60



Рис. 6
 Хондроитинсульфаты в цитоплазме хондробластов I типа через 2 недели после трансплантации; Хейл-реакция, 10 x 40

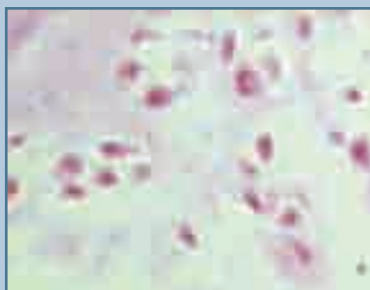


Рис. 7
 Гранулы гликогена в хондробластах I типа через 2 недели после трансплантации; Шик-реакция, 10 x 40

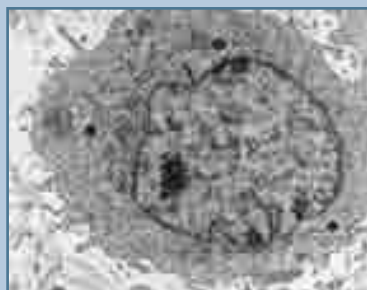


Рис. 8
 Ультраструктура хондробласта I типа, x5000



Рис. 9
 Хондроитинсульфаты в цитоплазме хондробластов II типа через 2 недели после трансплантации в межпозвонковый диск; окраска альциановым синим, 10 x 40

среднюю электронную плотность. Эухроматин расположен диффузно, гетерохроматин – примембранно. Органеллы – преимущественно полисомы, свободно расположенные на мембранах гранулярного ретикулума, который представлен в виде расширенных местами канальцев, заполненных электронно-плотным содержимым. Комплекс Гольджи (КГ) расположен приядерно, состоит из цистерн и мелких везикул. Митохондрии единичные, овальной формы, с хорошо контурирующимися кристами.

Клетки II типа площадью 98,5 мкм, крупные, овальной формы, с отростками, с обильной базофильной цитоплазмой. Вокруг клеток и в цитоплазме определяются реакции на хондроитинсульфаты (рис. 9). Окислительно-восстановительные ферменты диффузно заполняют цитоплазму этих клеток. Мелкие гранулы гликогена располагаются в приядерной зоне (рис. 10).

На ультраструктурном уровне среднедифференцированные хондробласты более крупные, чем хондробласты I типа. На мембране клеток сформированы отростки. Ацентральное расположенное ядро ограничено мембраной с множественными инвагинатами. Характерной особенностью этих клеток является наличие 1–2 ядрышек и преимущественно диффузный эухроматин. Эндоплазматическая сеть (ЭПС) занимает значительный объем цитоплазмы и представлена системой канальцев, местами имеющих расширения. Выявляются свободные рибосомы. КГ с большим количеством везикул расположен как приядерно, так и на полюсах клеток. Многочисленные митохондрии с плотным матриксом и ламилярными кристами контактируют с КГ и ЭПС (рис. 11).

Клетки III типа представлены крупными хондробластами овальной формы с площадью 196,20 мкм. В центре хондробласта располагается овальное ядро, содержащее 1–3 ядрышка. Цитоплазма интенсивно базофильно окрашена и содержит грану-

лы гликогена, хондроитинсульфат и незначительное количество кератансульфата. Вокруг клеток определяется матрикс, в котором идентифицируются хондроитинсульфаты А и С. Окислительно-восстановительные ферменты СДГ и НАД-Н-диафораза в виде мелких гранул заполняют всю цитоплазму (рис. 12). Ультраструктурной особенностью хондробластов III типа является наличие широкой ЭПС. КГ выявляется во всех полях клеток с большим количеством транспортных везикул, расположенных в зонах КГ, гладкой эндоплазматической сети и в области плазматической мембраны. Регистрируются эндо- и экзовезикулы, многочисленные митохондрии различной формы.

Через 1 мес. в центре ПЯ трансплантированные клетки формируют изогенные группы клеток с выраженной базофилией матрикса и цитоплазмы. Хондробласты по-прежнему образуют сообщества, местами встречаются митотически делящиеся клетки (рис. 13). Вокруг клеток реакции на сульфатированные ГАГ интенсивны. В этот период за счет митотического деления популяция клеток значительно увеличивается. В матриксе ПЯ сохраняются выраженные реакции на хондроитинсульфат.

Среди популяции трансплантированных клеток количество низкокодифференцированных клеток падает и нарастает количество средне- и высококодифференцированных хондробластов. Хондробласты формируют изогенные группы (рис. 14). Встречаются фигуры митоза. В цитоплазме и вокруг клеток выявляются хондроитинсульфат и незначительное количество кератансульфата. Между клетками видны тонкие коллагеновые волокна и хондроитинсульфаты, что свидетельствует о формировании матрикса (рис. 15). Индекс пролиферации высокий – 95 %. В окружающих трансплантацию зонах и в клетках интенсифицируются митотическая активность и процессы синтеза хондроитинсульфата.

Через 3 мес. после трансплантации в зоне пересадки сформирован ги-

линовый тканеспецифичный хрящ с гомогенным матриксом, окружающим изогенные группы клеток. В популяции клеток преобладают средне- и высококодифференцированные хондробласты. Коллагеновые волокна при обычных гистологических окрасках не выявляются. Иммуногистохимическими методами определяется коллаген II типа. Снижается индекс пролиферации до 80 %. Вокруг трансплантированных структур в клетках рыхловолокнистой части диска наблюдается активизация синтетических процессов, о чем свидетельствуют интенсивные реакции на хондроитинсульфат (рис. 16). В цитоплазме выявляются хондроитинсульфаты А и С, гликоген в виде диффузных гранул. Реакции на окислительно-восстановительные ферменты интенсивны. В матриксе, окружающем хондробласты, выявляется диффузное окрашивание при постановке реакций Хейла и Сидидмена. Надо полагать, что происходит активизация синтетических процессов в клетках по типу индукции, так как и в прослойках между пучками коллагеновых волокон интенсифицируются реакции на хондроитинсульфат (рис. 17).

Через 6 мес. после трансплантации в зоне ПЯ сформирован гиалиновый хрящ с гомогенным матриксом и хондронными структурами (рис. 18). Популяция клеток представлена преимущественно высококодифференцированными клетками, низкокодифференцированные хондробласты встречаются в виде единичных клеток. В матриксе выявляются высокополимерные хондроитинсульфаты А и С (рис. 19). Гликоген в виде мелкогранулярных структур определяется в цитоплазме пролиферирующих и изогенных хондробластов. Интенсифицированы реакции на окислительно-восстановительные ферменты: СДГ, НАД-Н-диафоразу. Индекс пролиферации низкий – 60 %. Процесса апоптоза и формирования гипертрофических хондроцитов не наблюдается. Ультраструктурная организация клеток



Рис. 10
Гранулы гликогена в хондробластах II типа через 2 недели после трансплантации; ШИК-реакция, 10 x 40

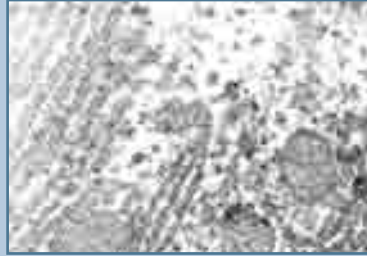


Рис. 11
Ультраструктура хондробласта II типа, x5000

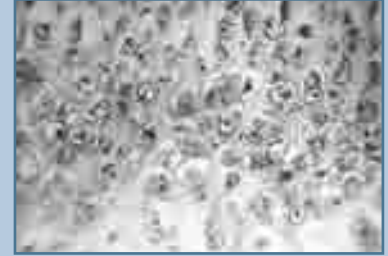


Рис. 12
Гранулы сукцинатдегидрогиназы в цитоплазме хондробластов III типа; реакция Нади, 10 x 40

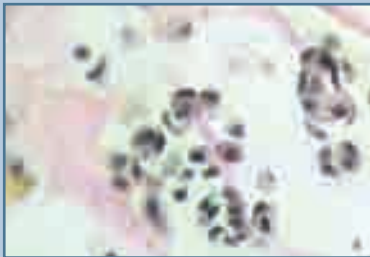


Рис. 13
Пролиферация клеток через 1 мес. после трансплантации хондробластов в межпозвонковый диск; окраска гематоксилин-эозином, 10 x 40

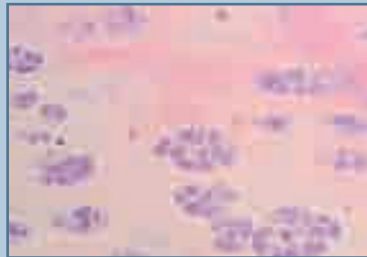


Рис. 14
Клетки формируют изогенные структуры через 1 мес. после трансплантации хондробластов в межпозвонковый диск; окраска гематоксилин-эозином, 10 x 40

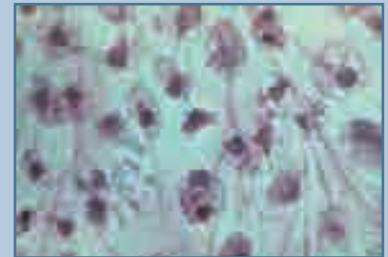


Рис. 15
Формирование матрикса в зоне трансплантации через 1 мес. после пересадки хондробластов в межпозвонковый диск; ШИК-реакция, 10 x 40



Рис. 16
В зоне трансплантации сформирован гиалиновый хрящ, хондроитинсульфаты в матриксе и цитоплазме клеток; Хейл-реакция, 10 x 40

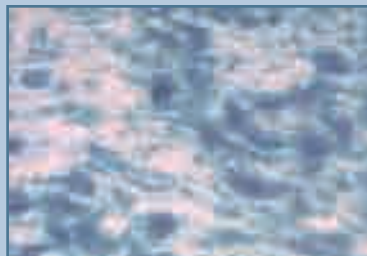


Рис. 17
Синтез протеогликанов в рыхло-волокнистой части диска через 3 мес. после трансплантации клеток в межпозвонковый диск; Хейл-реакция, 10 x 20



Рис. 18
Через 6 мес. после трансплантации в зоне пульпозного ядра сформирован гиалиновый хрящ с гомогенным матриксом и хондронными структурами; окраска гематоксилин-эозином, 10 x 40



Рис. 19

Высокополимерные хондроитин-сульфаты А и С в матриксе через 6 мес. после трансплантации; Хейл-реакция, 10 x 20

соответствует стадиям дифференцировки.

Обсуждение

При обсуждении полученных данных следует остановиться на следующих основополагающих вопросах:

- соответствие донорских клеток генно- и фенотипам ткани, в которую осуществлялась трансплантация;
- метаболическое обеспечение процессов функционирования клона донорских клеток;
- возможность восстановления утраченных функций диска при помощи трансплантации клеток.

Для ответа на поставленные вопросы были исследованы органоспецифические хондробласты разных пассажей, подбор которых осуществлялся путем углубленного исследования культивированных хондробластов I–V пассажей [4]. Морфологические и ультраструктурные исследования показали, что культивированные клетки, полученные из позвоночника новорожденных щенков на стадии хондрогенной дифференцировки, в процессе культивирования (II пассаж) сохраняют свой фенотип. Три степени дифференцировки хондробластов способны осуществить репаративную регенерацию поврежденного матрикса хряща за счет синтеза ПГ и коллагена II типа. Учитывая спе-

цифику хондробластов, отсутствие разобщенности синтеза и репродукции [2, 16], мало- и среднедифференцированные хондробласты обеспечивают как сохранение популяции клеток, так и гомеостаз матрикса. Кроме того, высокий уровень экспрессии гена агрекана (рис. 3) в культуре клеток II–III пассажей, соответствующий таковому в МПД [11, 13], является основанием для экспериментального моделирования коррекции нарушенных функций при остеохондрозе.

Вопрос о характере взаимодействия донорских клеток и коммитированной ткани решался путем трансплантации хондробластов II пассажа в интактный МПД животного. Как видно из фактических данных, трансплантированные хондробласты через 15 дней сохраняют свой фенотип, формируют колонии и контактируют посредством отростков. Как и в культуральной среде, *in vivo* эти клетки представлены тремя стадиями дифференцировки с преобладанием мало- и среднедифференцированных хондробластов. Отсутствие репродукции (митотического деления клеток), апоптоза и гетеросинтеза позволяет оценить это состояние трансплантированных клеток как стадию адаптации к условиям *in vivo*, а состояние хондробластов как стационарное. В процессе адаптации устанавливаются межклеточные взаимодействия, но процесс функционирования клеток осуществляется посредством ауто- и паракринной регуляции. На этой стадии функционирования клеток, когда все возможно, но еще ничего не решено [7], транскрибируются одни и те же последовательности ДНК, что создает метаболическую основу для последующей органоспецифической дифференцировки хондробластов. Через 30 дней после трансплантации наблюдается обособление хондробластов и активизация синтезирующего аппарата клеток (КГ, ЭПС, ядерного хроматина, формирование 1–2 ядрышек). В цитоплазме и вокруг выявляются сульфатированные ГАГ и тонкие коллагеновые волокна II типа. Наблюдаются

редкие митотически делящиеся клетки, активизируется синтез белков и РНК, определяющих дальнейший процесс дифференцировки клеток [6]. Хондробласты формируют изогенные группы клеток, вокруг которых выявляются ПГ, что свидетельствует о соответствии микроокружения трансплантированным клеткам. В пределах этой ниши осуществляется информационный обмен между трансплантированными и окружающими клетками. В формировании связей огромную роль играют молекулы внеклеточного матрикса, которые являются индукторами дифференцировки клеток [6]. Таким образом, дифференцировка хондробластов осуществляется в соответствии с генетической программой, но уже под влиянием внешних факторов. В этот период транскрибируются участки генома, кодирующие органоспецифические белки и ПГ, формируются рецепторный аппарат клеток и сложная система межклеточных взаимодействий [6]. В дальнейшем процесс дифференцировки клеток осуществляется при взаимодействии гормона роста и мембранных рецепторов хондробластов. Этот этап следует определить как органоспецифическую дифференцировку хондробластов, что подтверждается формированием изогенных и колонковых структур. Необходимо остановиться на возможностях дифференцировки клеток в культуральной среде и при трансплантации *in vivo*. В культуральной среде после многочисленных пассажей дифференцировка хондробластов происходит путем пара- и аутокринной регуляции клеточных популяций, в связи с чем формирования органных структур (ПР, суставного хряща) не происходит.

При трансплантации хондробластов *in vivo* в соответствующую метаболическую среду, в ПЯ, матрикс, которого состоит из ПГ [18], процесс регуляции осуществляется на органном уровне. Вполне резонно предположить, что клетки провизорного хряща, реализующие полную генетическую программу, должны подвергнуть-

ся апоптозу с последующим формированием остеогенных структур. Однако исследование структурных компонентов МПД в течение года показало, что процесс остеогенеза не развивается. Хондробласты сохраняют синтетические потенции, фенотипы. Объяснение может быть следующим: процесс остеогенеза запускается геном люмникана, а экспрессия этого гена зависит от отсутствия антиинвазивного фактора, специфических ПГ и сосудистой инвазии. При трансплантации

в МПД, в котором экспрессируется ген агрекана, хондроциты изолированы от сосудов своеобразным хондрогематическим барьером, и при отсутствии повреждающих факторов (сосудистой инвазии) хондробласты сохраняют свой фенотип.

Заключение

Хондробласты в соответствующей культуральной среде осуществляют свои гено- и фенотипические программы на уровне общей дифферен-

цировки по типу пара- и аутокринной регуляции. В процессе трансплантации *in vivo* реализуется многоуровневая комплексная эволюционно закрепленная регуляция, что обеспечивает формирование органной структуры.

Полученные данные являются основанием для разработки методов коррекции ранних стадий остеохондроза в клинических условиях.

Литература

1. Жданов Д.А. Лекции по функциональной анатомии человека. М., 1979.
2. Зайдман А.М. Идиопатический сколиоз. Новосибирск, 1994.
3. Зайдман А.М., Бурухин А.В., Лазарев А.А. Структурные изменения межпозвонковых дисков в острой стадии остеохондроза и их значение в патогенезе болезни. Морфологическое и автордиографическое исследование // Инф. бюл. СО АМН СССР. 1982. № 4. С. 58–63.
4. Зайдман А.М., Сахаров А.В., Колокольцева Т.Д. Культура хондробластов как потенциальный источник для тканевой инженерии при повреждениях и заболеваниях позвоночника // Хирургия позвоночника. 2004. № 4. С. 115–121.
5. Зайдман А.М., Филиппова Г.Н. Структурно-метаболические особенности диска при остеохондрозе и возможности его коррекции. Патология позвоночника. Л., 1980.
6. Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М., 1977.
7. Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М. Мезенхимальные стволовые клетки // Бюл. эмбриологии. 2002. Т. 133. № 2. С. 1284–131.
8. Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction // Anal. Biochem. 1962. Vol. 4. P. 330–334.
9. DePalma A.F., Rothman R.H. The intervertebral disc. Philadelphia, 1970.
10. Domisse G.F. The vulnerable, rapidly growing thoracic spine of the adolescent // S. Afr. Med. J. 1990. Vol. 78. P. 211–213.
11. Byring E.J. The biochemistry and physiology of the intervertebral disc // Clin. Orthop. Relat. Res. 1969. N 67. P. 16–28.
12. Hashizume H. Three-dimensional architecture and development of lumbar intervertebral discs // Acta. Med. Okayama. 1980. Vol. 34. P. 301–314.
13. Hayes A.J., Benjamin M., Ralphs J. Extracellular matrix in development of the intervertebral disc // Matrix Biol. 2001. Vol. 20. P. 107–121.
14. Johnson P.H. The lumbar disc // J. Ark. Med. Soc. 1979. Vol. 75. P. 297–301.
15. Nachemson A. Towards a better understanding of low-back pain: a review of the mechanics of lumbar disc // Rheumatol. Rehabil. 1975. Vol. 14. P. 129–143.
16. Selard E., Shirazi-Adl A., Urban J.P. Finite element study of nutrient diffusion in the human intervertebral disc // Spine. 2003. Vol. 17. P. 1945–1953.
17. Taylor T.K., Melrose J., Burkhardt D., et al. Spinal biomechanics and aging are major determinants of the proteoglycan metabolism of intervertebral disc cells // Spine. 2000. Vol. 25. P. 3014–3020.
18. Urban J.P., Roberts S. Development and degeneration of intervertebral discs // Mol. Med. Today. 1995. Vol. 1. P. 329–335.
19. Van de Lest C.H., Versteeg E.M., Veerkamp J.H., et al. Quantification and characterization of glycosaminoglycans at the nanogram level by a combined azure A-silver staining in agarose gels // Anal. Biochem. 1994. Vol. 221. P. 356–361.
20. White A.A., Panjabi M.M. Clinical Biomechanics of the Spine. Philadelphia, 1978.

Адрес для переписки:

Зайдман Алла Михайловна
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
НИИТО,
AZaydman@niito.ru

Статья поступила в редакцию 21.03.2007