



КУЛЬТУРА ХОНДРОБЛАСТОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ И ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПОЗВОНОЧНИКА

А.М. Зайдман¹, А.В. Сахаров², Т.Д. Колокольцова³

¹Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии

²Новосибирский государственный педагогический университет

³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Новосибирск

Морфологические и ультраструктурные исследования показали, что культивируемые клетки, полученные из позвоночника эмбрионов на стадии хондрогенной дифференцировки, в процессе культивирования сохраняют свой фенотип. Хондробласты на разной стадии дифференцировки (юные, молодые и зрелые) способны обеспечить как репаративную регенерацию, так и гомеостаз поврежденного матрикса хряща за счет синтеза протеогликанов и коллагена. Полученные данные являются основанием для использования первичной культуры хондробластов в клеточной инженерии при повреждении и заболевании позвоночника.

Ключевые слова: культура клеток, хондробласт, дифференцировка, ультраструктура.

CHONDROBLAST CULTURE AS A POTENTIAL SOURCE FOR TISSUE ENGINEERING IN SPINE INJURY AND DISEASE

A.M. Zaidman, A.V. Sakharov, T.D. Kolokoltsova

Morphological and ultrastructural investigations have shown that cultivated cells from the embryonic spine at the stage of chondrogenic differentiation preserve their phenotype during cultivation. The chondroblasts at various differentiation stages (junior, young, and mature) ensure both reparative regeneration and homeostasis of an injured cartilage matrix at the expense of the synthesis of proteoglycans and collagen.

The data obtained are the basis for use of primary chondroblast culture in cell engineering for treatment of spine injuries and diseases.

Key words: cell culture, chondroblast, differentiation, ultrastructure.

Hir. Pozvonoc. 2004;(4):115–121.

Введение

В настоящее время наблюдается значительный рост числа работ, основанных на современных клеточных технологиях, которые посвящены регенерации хряща: первичных клеточных культурах, клеточной и тканевой инженерии [7, 12]. Однако несмотря на стремительное развитие исследований в области тканевой инженерии хряща, проблема выбора оптимального клеточного материала для регенерации поврежденного хрящевого дефекта пока не решена. В этом аспекте фетальные клетки являются универсальным модулем для любых

клеточных реконструкций [10]. Донорские клетки встраиваются в организм человека и позволяют создавать устойчивые ростки новой, здоровой ткани в поврежденных зонах [13, 15]. Клеточная и тканевая инженерия могут быть использованы при травматическом повреждении зон роста, коррекции деформаций позвоночника на ранних стадиях сколиотической деформации у детей и повреждениях замыкательной пластинки диска, сопровождаемых переломами тел позвонков [5, 8]. По данным литературы, имеются серьезные аргументы против использования в лечебной практике эмбриональных стволовых

клеток [6]. Это связано не только с вопросами этики, но, прежде всего, с высоким пролиферативным потенциалом этих клеток. Одним из вариантов решения этой проблемы является получение и использование при тканевой инженерии как специализированных зрелых клеток, так и клеток на стадии тканеспецифической дифференцировки. Целью работы является исследование первичной культуры хондробластов, полученных из эмбриональной хрящевой ткани в качестве потенциального источника клеточного материала для тканевой инженерии при лечении повреждений позвоночника.

Материалы и методы

Материалом исследований послужили клетки гиалинового хряща, извлеченные в стерильных условиях из позвоночника эмбриона человека 12-недельного возраста. После механического измельчения, а затем обработки в 1,5 % растворе коллагеназы суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр, центрифугировали в течение 10 мин при 1500 оборотов в минуту и помещали для ресуспензирования в ростовую среду ДМЕМ. Культивирование клеток проводили в питательной среде ДМЕМ с добавлением 20 % FBS. На втором пассаже стекла с первичной клеточной культурой помещали для фиксации в этанол и забирали для проведения морфогистохимического исследования. Для проведения ультраструктурного анализа часть клеток монослоя снимали с поверхности смесью трипсина 0,02 % и версена 0,025 %. Осадок центрифугировали, а затем фиксировали в 4 % растворе параформа, дофиксировали 1 % раствором OsO_4 , обезживали в спиртах возрастающей концентрации, заключали в эпон-аралдит. На ультратоме «Raichert» готовили ультратонкие срезы, контрастировали уранилацетатом и просматривали под электронным микроскопом «Hitachi-100». Для изучения морфометрических характеристик осадок из клеток монослоя окрашивали гематоксилином и эозином. Обработку статистических данных проводили с использованием комплекса оптического структурного анализа «Carl Zeiss», а также программ «AxionVision 3» и «Motic Images». В клетках монослоя на стекле и в осадке, полученном при снятии клеток с монослоя, выявляли гликоген и гликопротеины при постановке ШИК-реакции с ферментативным контролем амилазой. Сульфатированные и несulfатированные гликозаминогликаны (ГАГ) выявляли Хейл-реакцией, альциановым и толуидиновым синим при различных значениях pH рас-

творителя. Реакцию на НАД-Н диафоразу и СДГ ставили по Нади и Нахласу.

Результаты

Из первичной культуры эмбрионального хряща позвоночника на II пассаже выделено три типа клеток (рис. 1).

Первый тип представлен мелкими клетками овальной формы площадью 60,90 мкм. Крупное ядро преимущественно овальной, реже бобовидной формы располагается в клетке центрально. Контуры клетки ровные, цитоплазма окрашивается базофильно, что свидетельствует об активном синтезе РНК. При постановке ШИК-реакции (контроль с амилазой) в цитоплазме клеток выявляются диффузно расположенные гранулы гликогена (рис. 2). Реакция с толуидиновым синим при значениях pH раствора красителя 5,0; 2,5 и 1,5 свидетельствует о синтезе хондроцитами несulfатированных и sulfатированных ГАГ: гиалуриновой кислоты и хондроитинсulfата. Бледная Хейл-реакция в цитоплазме клеток I типа свидетельствует о низкополимерном состоянии синтезируемых ГАГ. Выявленные биохимические соединения являются основными биополимерами клеток, детерминированных в направлении

хондрогенеза, и отражают начальные этапы дифференцировки хондробластов. Гранулы ферментов окислительно-восстановительного ряда (СДГ и НАД-Н диафоразы) локализованы преимущественно в околоядерной области (рис. 3, 4).

На электронограммах первый тип представлен клетками с крупным

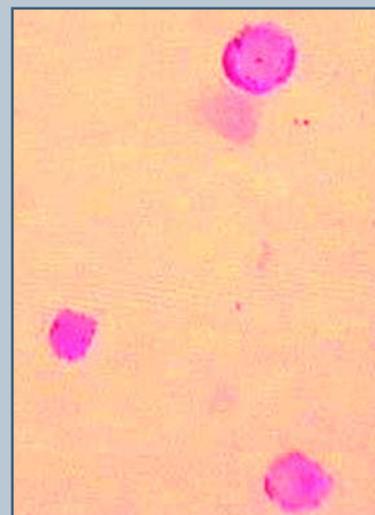


Рис. 2
Гликоген в клетках I типа (ШИК-реакция); 10 x 40

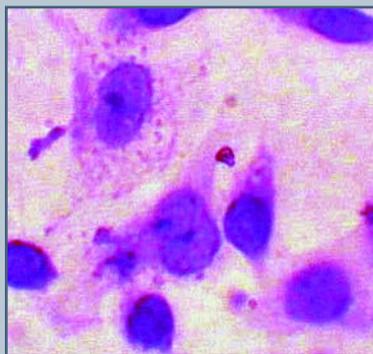


Рис. 1
Клетки трех типов в монослое на стекле. Гематоксилин-эозин; 10 x 60

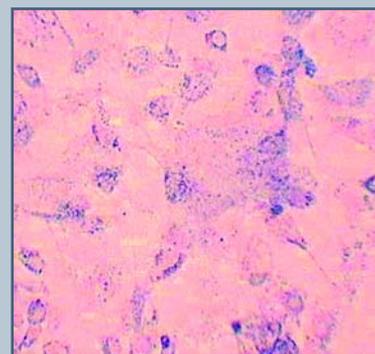


Рис. 3
Гранулы СДГ в цитоплазме клеток трех типов. Монослой на стекле; 10 x 40

ядром, занимающим более половины объема цитоплазмы. Ядерная мембрана отграничивает немногочисленные инвагинаты. На наружной ядерной мембране в области ядерных пор располагаются многочисленные рибосомы (рис. 5). Ядрышко, как правило, одно и располагается в нуклеоплазме эксцентрично. Плазмалемма образует многочисленные короткие отростки. Цитоплазматический матрикс этих клеток отличается повышенной электронной плотностью. Рибосомальный аппарат является доминирующим органоидом клеток первого типа. Он

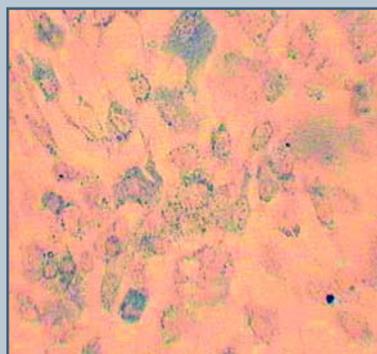


Рис. 4
Реакция на НАД-Д диафорузу
в клетках 3 типов; 10 x 40

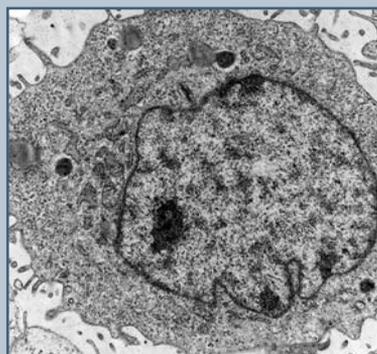


Рис. 5
Ультраструктура хондробласта
I типа; x5000

представлен рибосомами и полисомами, свободно расположенными в цитоплазме, а также фиксированными на мембране гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР). ГЭР развит незначительно и выявляется в виде коротких, узких цистерн, а на поперечных срезах имеет вид овальных профилей (рис. 6), иногда расширенных и заполненных гомогенным веществом, имеющим более высокую электронную плотность, чем цитоплазматический матрикс. Комплекс Гольджи (КГ) развит слабо и располагается в околядерной зоне. Представлен двумя – тремя узкими цистернами, содержащими на периферии незначительное количество мелких везикул. Морфологически можно выделить три типа везикул: гладкоконтурные и два типа окаймленных. Гладкоконтурные везикулы образованы тонкой мембраной и заполнены веществом с низкой электронной плотностью. Окаймленные везикулы первого типа локализованы вблизи плазматической мембраны и представляют собой образования с электронно-прозрачным центром. На их внутренней мембране отмечается конденсация мелкодисперсного содержимого высокой электронной плотности. Второй тип – мелкие окаймленные везикулы, заполненные крупно- и мелкогранулярным содер-

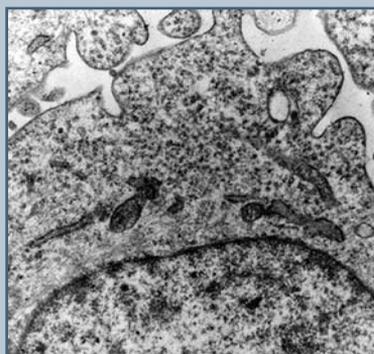


Рис. 6
Транспортные везикулы в клетке I типа; x12000

жимым высокой электронной плотности, располагаются в области ГЭР. Митохондрии немногочисленны и находятся в околядерной области. Обычно имеют вытянутую, а на поперечных срезах овальную или округлую форму. Крысты длинные, листовидной формы, не всегда различимы на фоне матрикса повышенной электронной плотности. В ряде случаев наружная мембрана митохондрий контактирует с мембраной ГЭР. Лизосомы представлены в основном гетерофагосомами и аутофагосомами. Среди включений идентифицируются мелкие гранулы гликогена.

Клетки II типа в суспензии культуры клеток имеют овальную форму или вытянутую – в монослое на стекле (рис. 7). Площадь клеток составляет 98,50 мкм. Ядро в большинстве случаев бобовидной формы и, как правило, смещено к одному из полюсов клетки, содержит 1–2 ядрышка. Клетки формируют длинные цитоплазматические отростки, которые контактируют с цитоплазмой соседних клеток. Результаты морфометрического анализа показывают, что по сравнению с клетками I типа отмечается статистически достоверное снижение ядерно-цитоплазматического отношения, которое свидетельствует о повышении степени дифференцировки этих клеток. Типичным признаком является присутствие митотически делящихся клеток (рис. 8). Для клеток II типа характерным признаком является значительное накопление гликоге-



Рис. 7
Клетки II типа. Гематоксилин
и эозин; 10 x 40

на (ШИК-реакция с контролем амилазой) и усиление синтеза сульфатированных и несulfатированных ГАГ (хондроитинсульфат А, С и кератансульфат, рис. 9) в высокополимерной форме (Хейл-реакция). Ферменты НАД-Н и СДГ локализируются как в околоядерной зоне, так и на периферии клетки (рис. 3, 4).

На электронограммах ядро клеток II типа имеет бобовидную форму. Контур ядрерной мембраны неровные и отграничивают многочисленные инвагинаты (рис. 10). В нуклеоплазме выявляются 1–2 ядрышка,

которые отличаются четко выраженным фибриллярным и гранулярным компонентами. Ультраструктурно можно отметить некоторое просветление цитоплазматического матрикса. ГЭР и КГ более развиты, чем у клеток I типа. Значительно увеличиваются по количеству и объему мелкие и крупные везикулы (рис. 11). Полярность распределения ГЭР и КГ в клетке четко выражена (рис. 12). В области выпуклой поверхности ядра ГЭР и КГ представлены узкими цистернами. Обилие мелких везикул, связывающих мембраны ГЭР с КГ,

а также локализованных в области плазматической мембраны, с нашей точки зрения, может свидетельствовать о том, что это полюс клетки, где идет активный эндоцитоз и синтез преимущественно мембранных компонентов для нужд самой клетки.

На противоположном полюсе клетки, со стороны вогнутой поверхности ядра, цистерны ГЭР значительно расширены и заполнены мелкозернистым содержимым повышенной электронной плотности по отношению к цитоплазматическому матриксу. Зона КГ, расположенная в области инвагинации ядра, характеризуется везикулярно-ламеллярным типом строения и имеет четко выраженную незрелую и зрелую поверхности. Со стороны трансперфорации КГ, обращенной в сторону плазматической мембраны, выявляются все три описанных ранее типа везикул, количество и объем которых значительно больше, чем на противоположном полюсе клетки. Надо полагать, что на этом полюсе происходит активный синтез и накопление специфических продуктов синтеза.

Лизосомный аппарат клеток представлен первичными лизосомами и аутофагосомами. Митохондрии встречаются как молодые, палочковидной формы с электронно-плотным матриксом, маскирующим кри-

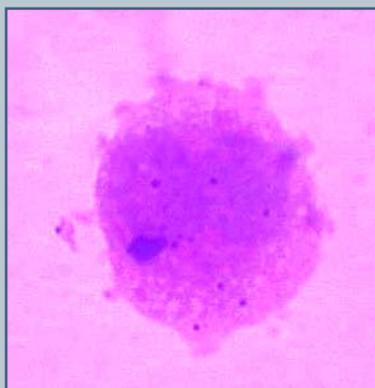


Рис. 8

Митоз в клетках II типа. Гематоксилин и эозин; 10 x 40

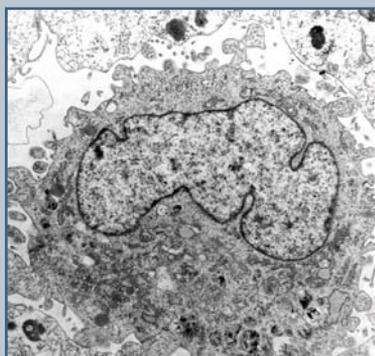


Рис. 10

Ультраструктура клеток II типа; x5000

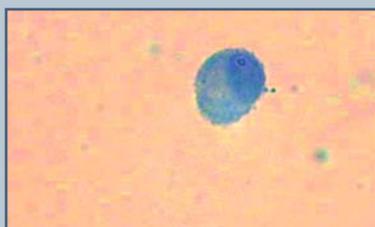


Рис. 9

Хондроитинсульфат С в цитоплазме хондробластов II типа. Реакция с альциановым синим (контроль с гиалуронидазой); 10 x 40

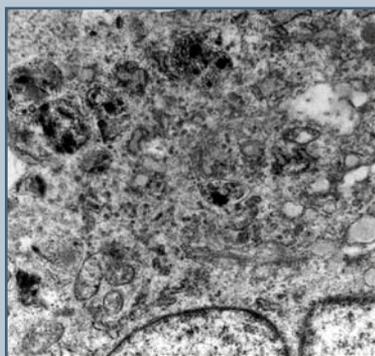


Рис. 11

Активный комплекс Гольджи в клетках II типа; x10000

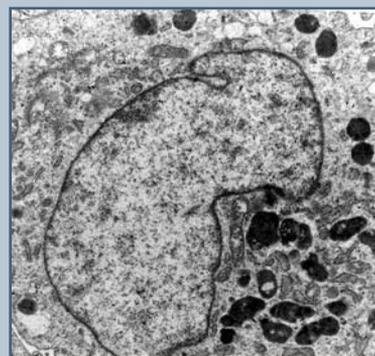


Рис. 12

Полярность расположения оргanelл в клетках II типа; x5000

ты, так и зрелые, с хорошо выраженными ламеллярными кристами и просветленным матриксом, которые находятся в тесном контакте с КГ и ГЭР. Следует отметить, что количество митохондрий у клеток II типа возрастает по сравнению с клетками более низкой стадии дифференцировки. Среди включений выявляются многочисленные гранулы гликогена.

III тип представлен крупными клетками овальной формы площадью 196,20 мкм (рис. 13). Центральное расположенное светлое ядро площадью 59,28 мкм в большинстве случаев содержит одно ядрышко. Плазматическая мембрана формирует два-три коротких отростка. Контакты с соседними клетками не наблюдаются. В цитоплазме обнаруживаются гранулярные включения гликогена (рис. 14). При постановке реакции с толудиновым синим (рН 2,5) в цитоплазме клеток выявляется γ -метахромазия. Контрольный ферментализ с гиалуронидазой позволил идентифицировать хондроитинсульфаты А и С, а также кератансульфат. НАД-Н диафоразы и СДГ в виде мелких гранул заполняют всю цитоплазму. Ультраструктурно клетки III типа представлены крупными клетками преимущественно округлой или овальной формы. Цитоплаз-

ма занимает значительный объем клетки. Ядро содержит более диспергированный эухроматин. Цитоплазматический матрикс значительно просветлен по сравнению с клетками I и II типа. Плазматическая мембрана местами теряет четкие контуры, особенно в зоне трансмембранного переноса, где формируются эндоцитозные везикулы. Рибосомы располагаются в гиалоплазме в виде полисом или свободно, а также фиксированы на мембране ЭР. ГЭР представлен широкой сетью цистерн, которые местами чрезмерно расширены. Просвет цистерн заполнен четко выраженным гранулярным и волокнистым содержимым невысокой электронной плотности. КГ характеризуется высокой степенью организации и занимает значительный объем цитоплазмы, имеет хорошо выраженный везикулярный, ламеллярный и вакуолярный компоненты (рис. 15). Наличие большого количества мелких окаймленных везикул в зоне КГ и ГЭР может также свидетельствовать о высокой функциональной активности клетки. Митохондрии крупные, овальной формы,

с просветленным матриксом. Микрофиламенты и микротрубочки представлены в большом количестве и располагаются в цитозоле диффузно. Лизосомы наиболее широко представлены аутофагосомами и присутствуют в несравненно больших количествах, чем в клетках более низкой степени дифференцировки. По характеру содержимого можно выделить два типа аутофагосом: заполнен-

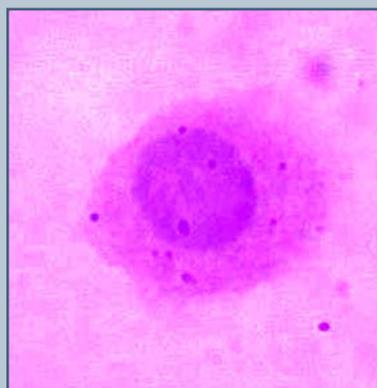


Рис. 13

Хондробласт III типа в моно-слое на стекле. Гематоксилин и эозин; 10 x 40

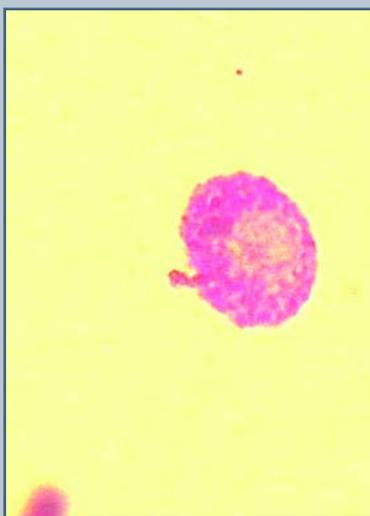


Рис. 14

Обильные гранулы гликогена в цитоплазме хондробластов III типа. ШИК-реакция; 10 x 40

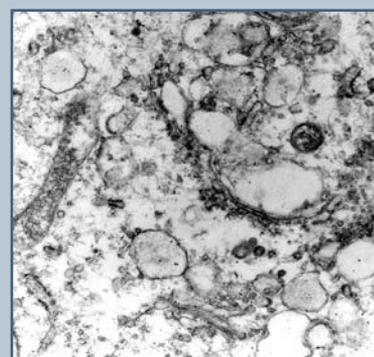


Рис. 15

КГ с развитым везикулярным, ламеллярным и вакуолярным компонентами в клетках III типа; x17000

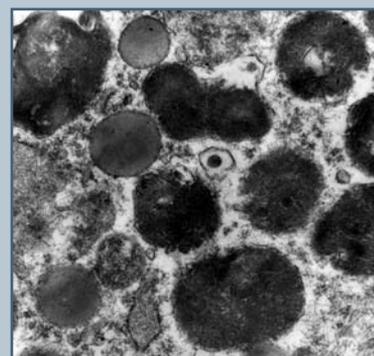


Рис. 16

Аутофагосомы, заполненные гранулярным и фибриллярным содержимым в клетках III типа; x20000

ные гранулярными структурами высокой и средней электронной плотности, а также фибриллярным содержанием (рис. 16). В гиалоплазме выявляются многочисленные скопления гранул гликогена и липиды.

Обсуждение

При обсуждении полученных данных следует остановиться на главных вопросах, связанных с возможностью использования культивированных клеток для замещения поврежденных тканей позвоночника. Прежде всего, это фенотипическая характеристика исследуемого материала, репаративный потенциал клеток и обеспечение структурной и функциональной полноценности матрикса хряща в зонах повреждения.

Методами морфогистохимии и ультраструктурного анализа культивированные клетки по степени дифференцировки разделены на три типа:

- малодифференцированные (юные);
- среднедифференцированные (молодые);
- дифференцированные (зрелые).

Критериями степени дифференцировки явились митотическая активность, специфические синтезы и ультраструктурная организация клеток [1–4].

Юные клетки коммитированы в сторону хондрогенной дифференцировки, о чем свидетельствуют их малые размеры, ядерно-цитоплазматические отношения больше единицы, синтез гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата С. Доминирующей

органеллой клетки является рибосомальный аппарат. Единичный КГ расположен приядерно. Продукция белков и протеогликанов обеспечивает процесс роста и репродукции [14, 16].

Ко второй группе клеток относятся крупные, активно синтезирующие хондроитинсульфаты А и С, кератансульфат, митотически делящиеся клетки. Для этих клеток характерна высокая ультраструктурная организация: широкая эндоплазматическая сеть, рассредоточение КГ по всей цитоплазме, обилие митохондрий, везикул, полярность. Все перечисленное относится к характерным морфологическим признакам молодых хондробластов [1, 3, 9, 11].

Третья группа – это крупные клетки с центрально расположенным ядром. Хроматин диспергирован, митозы отсутствуют, но специфические для хондробластов синтезы (синтез хондроитинсульфатов А, С, кератансульфата) интенсивны. Густо разветвленная сеть гладкого эндоплазматического ретикулума, обширные поля КГ и большое количество окаймленных везикул, связанных как с цистернами гладкого эндоплазматического ретикулума, так и с КГ, позволяют характеризовать эту популяцию клеток как зрелые хондробласты [3, 14, 17].

Таким образом, морфологические исследования культивированных клеток позволили характеризовать последние как хондробласты разной степени дифференцировки. Степень дифференцировки определялась в зависимости от размеров и формы клеток, ядерно-цитоплазматических отношений, митотической активности,

последовательности синтезов (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты С, А, кератансульфат) и от усложнения ультраструктурной организации – количества и распределения органелл, эндоплазматической сети, КГ, митохондрий.

Заключение

Таким образом, морфологические и ультраструктурные исследования показали, что культивированные клетки, полученные из позвоночника эмбрионов на стадии хондрогенной дифференцировки, в процессе культивирования (II пассаж) сохраняют свой фенотип. Три степени дифференцировки хондробластов способны обеспечить репаративную регенерацию поврежденного матрикса хряща за счет синтеза протеогликанов и коллагенов. Кроме того, учитывая специфику хондробластов, отсутствие разобщенности синтеза и репродукции [1, 3], мало- и среднедифференцированные хондробласты обеспечивают как сохранение популяции клеток, так и гомеостаз матрикса. Полученные данные являются основанием для использования первичной культуры хондроцитов в качестве материала для тканевой инженерии при повреждении и заболевании позвоночника.

Литература

1. **Зайдман А.М.** Идиопатический сколиоз. Новосибирск, 1994.
2. **Зирне Р.А., Аршавская Т.В.** Динамика ультраструктуры хондрогенной ткани в процессе ее развития. Рига, 1990.
3. **Павлова В.Н., Копьева Т.И., Слудский Л.И. и др.** Хрящ. М., 1988.
4. **Тохин Б.И.** Проблемы радиационной биологии и цитологии. Л., 1974.
5. **Abukawa H., Shin M., Williams W.B., et al.** Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone // *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2004. Vol. 62. P. 601–606.
6. **Colter D.C., Class R., DiGirolama C.M., et al.** Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. P. 3213–3218.
7. **Gangji V., Hauzeur J.P., Schoutens A., et al.** Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head // *J. Rheumatol.* 2003. Vol. 30. P. 348–351.
8. **Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., et al.** Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta // *Nat. Med.* 1999. Vol. 5. P. 309–313.
9. **Iozzo R.V., Pacifici M.** Ultrastructural localization of the major proteoglycan and type II procollagen in organelles and extracellular matrix of the cultured chondroblasts // *Histochemistry.* 1986. Vol. 86. P. 113–122.
10. **Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., et al.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // *Nature.* 2002. Vol. 418. P. 41–49.
11. **Kaps C., Fuchs S., Endres M., et al.** [Molecular characterization of tissue - engineered articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleece] // *Orthopade.* 2004. Vol. 33. P. 76–85.
12. **Kim D.J., Moon S.H., Kim H. et al.** Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells // *Spine.* 2003. Vol. 28. P. 2679–2684.
13. **Madry H., Cucchiari M., Stein U., et al.** Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system // *J. Gene. Med.* 2003. Vol. 5. P. 502–509.
14. **Olney R.C., Wang J., Sylvester J. E., et al.** Growth factor regulation of human growth plate chondrocyte proliferation in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 317. P. 1171–1182.
15. **Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., et al.** Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells // *N. Engl. J. Med.* 2001. Vol. 344. P. 385–386.
16. **Trippel S.B., Ghivizzani S.C., Nixon A.J.** Gene - based approaches for the repair articular cartilage // *Gene. Ther.* 2004. Vol. 11. P. 351–359.
17. **Wang J., Yang Z.M., Qin T.W., et al.** [Ultrastructure of cultured cartilage, articular cartilage, growth plate and meniscus] // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2003. Vol. 17. P. 247–250.

Адрес для переписки:

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