

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ ХОНДРОЦИТОВ С ЦЕЛЬЮ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ДЕФЕКТОВ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

Белорусский государственный медицинский университет¹,
Белорусский НИИ травматологии и ортопедии²

Данное исследование посвящено отработке методических подходов по выделению хондроцитов из взрослой и фетальной хрящевых тканей и поддержанию полученных клеток в виде монослойной культуры. Доказано, что добавление ряда ростовых факторов, таких как инсулин, трансферрин, селенит, фактор роста фибробластов, трансформирующий фактор роста, в культуральную среду позволяет сохранить хондроцитарный фенотип клеток в течение длительного промежутка времени без признаков дедифференцировки. Использование стабилизированного полипептидного матрикса обеспечивает равномерное распределение хондроцитов в трехмерном пространстве и воспроизведение их хрящеподобной организации.

Для лечения суставных дефектов в травматологии было предложено множество подходов, связанных с оперативными вмешательствами в области сустава (абразивная хондропластика, микропереломы субхондральной кости и др.) которые, однако, до сих пор не могут обеспечить стабильную клиническую ремиссию. В результате этого многих ученых заинтересовал вопрос о возможности трансплантации аутологичных хондроцитов в область хондрального дефекта.

Впервые аутогенные хондроциты для замещения дефектов суставного хряща использовал Бриттберг в 1968 году [4]. При этом в область суставного дефекта были введены культивированные хондроциты в составе суспензии. У большинства пациентов было зарегистрировано восстановление функции сустава, при этом у 12 пациентов из 22 в биоптатах из области трансплантации была обнаружена гиалиноподобная хрящевая репарация.

Последующие исследования культуры хондроцитов и сама процедура трансплантации подняли новые проблемы: сохранение фенотипа хондроцитов в течение продолжительного культивирования монослоя [3], риск утечки хондроцитов со стороны несущей поверхности в случае их трансплантации в виде суспензии и проблема равномерного распределения клеток в трехмерном пространстве дефекта [7].

Коллаген, фибриновый клей, альгинат и агароза ока-

зались многообещающими носителями для поддержания фенотипа хондроцитов [8]. В одном из исследований было доказано что человеческие хондроциты культивируемые в коллагене, сохраняют свой фенотип и синтезируют матриксный хондроитин-6-сульфат а также равномерно распределяются в трехмерном пространстве без риска утечки перевиваемых клеток [3].

Кроме того, как уже указывалось выше, для сохранения фенотипа хондроцитов важным является подбор дифференцировочных агентов и факторов, способствующих более быстрому росту культуры и ее стабилизации.

Целью нашего исследования явилась разработка подходов к выделению и обогащению культуры хондроцитов с последующей дифференцировкой в полноценную хрящеподобную структуру.

Материал и методы

Исследования проводилось на базе ЦНИЛ БГМУ. Для изучения характера пролиферативных и морфогистотипических процессов в культуре клеток использовались фрагменты хрящевой ткани, взятые из организма экспериментальных животных и фрагменты хряща, полученные в ходе эндопротезирования суставов в клинике, а также фрагменты фетального хряща плодов кроликов. Все манипуляции проводили в стерильных условиях с оценкой жизнеспособности полученных клеток непосредственно перед ферментацией.

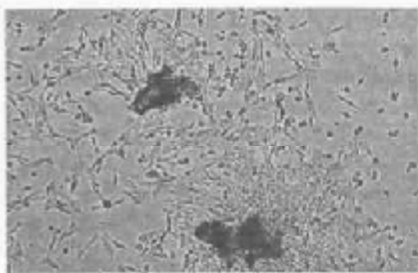


Рис.1. Монослой хондроцитарной культуры, полученной из суставного хряща взрослого животного. Ув.200X

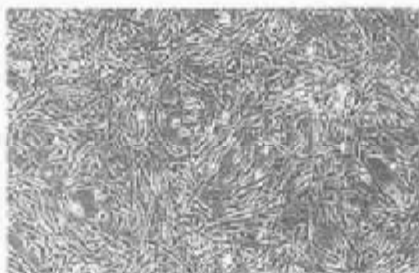


Рис.2. Свежая культура фетальных хондроцитов на 9 день культивирования. Ув. 100X.

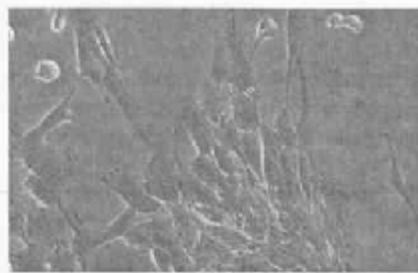


Рис.3. Морфология хондроцитов, полученных из фетальных тканей. Ув.400X.

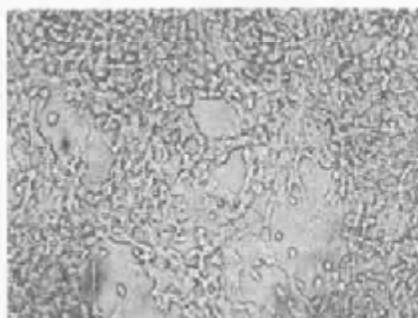


Рис.4. Накопление клеточных элементов в составе коллагена после 2-3 пассажа. Ув. 200X

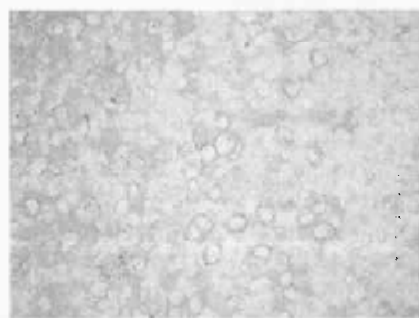
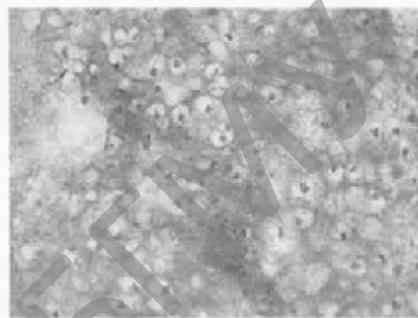


Рис.5. Гистологическая окраска фрагмента полипептидного матрикса с хондроцитами: А – альциановый синий, Б – сафрония-О. Ув. 400X.



Для получения культуры клеток хондроцитов использовали методику K.F.Almqvist et al., 2001 с модификациями [1]. Получение клеточных культур из взрослых тканей проводилось по стандартной методике, а фетальные хрящевые фрагменты ферментировали в более щадящих условиях с сокращением времени инкубации в ферментативных растворах.

Культивирование хондроцитов в составе коллагенового геля. При достижении конфлюэнтного монослоя хондроциты снимали с поверхности культуральных флаконов (7-10 сутки) с помощью специального шпателя, ресуспендировали в среде F-12 с 5% фетальной бычьей сывороткой и антибиотиками, центрифугировали 4 мин при 800rpm, заключали в состав коллагенового покрытия, предварительно оценив жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим (0,4%) в концентрации $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Коллагеновый гель готовили в соответствии с методикой Jin Lu et al. [6]. Культура инкубировалась при 37°C и 5% CO₂ со сменой культуральной среды F-12, содержащей L-аскорбиновую кислоту (50мкг/мл), 10% фетальную бычью сыворотку, L-глутамин (2 мМ) и антибиотики (пенициллина 100МЕ/мл, стрептомицина 100 мг/мл) через сутки.

Культивирование хондроцитов в составе полипептидного (желатинового) матрикса. Хондроциты на стадии конфлюэнтной культуры снимали с поверхности культуральных флаконов как описано выше. После оценки жизнеспособности клеток в тесте с трипановым синим (0,4%) клетки ресуспендировали в культуральной среде ($1 \cdot 10^6$ кл/мл) и помещали в состав фрагмента (1 см², h=200мкм) стерильной пористой полипептидной матрицы, стабилизированной альбумином.

В последующие сутки на губку осторожно наслаивали тонкий слой свежей культуральной среды по мере изменения pH последней, смену среды не производили. Культивировали при 37°C и 5% CO₂.

Гистологическая окраска. Иммуногистохимический анализ. Для выявления сульфатированных протеогликанов в экстрацеллюлярном матриксе культивируемых хондроцитов использовали краситель альциановый синий [5]. Было осуществлено иммуногистохимическое окрашивание клеток на наличие продукции коллагена II типа [2].

Результаты и обсуждение

Культивирование суспензии единичных хондроцитов показало, что культура, получаемая из фетальных хрящевых тканей, обладает более высокой пролиферативной способностью, чем культура из зрелых тканей. Фетальная культура более стабильна, не требует длительного времени размножения клеток и обладает низкой степенью дедифференцировки, претерпевая несколько пассажей.

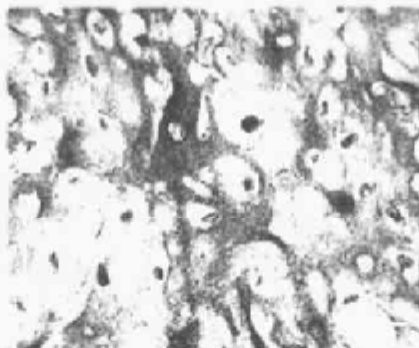


Рис.6. Иммуногистохимическая визуализация коллагена 2-го типа с помощью пероксидазной метки в составе хондроцитарной ткани. Ув. 400X.

Полученные данные подтверждают то, что наибольшим потенциалом развития обладают культуры хондроцитов, полученные на основе прогениторных фетальных клеток. В то же время клетки зрелой хрящевой ткани относительно стабильны при культивировании в составе кластеризованной культуры.

Заключение культур клеток в состав коллагена и полипептидного матрикса способствовало сохранению фенотипа хондроцитов и их равномерному распределению в трехмерном пространстве. Однако в дальнейшем стало понятно, что коллагеновый матрикс рациональнее использовать для накопления культуры хондроцитов, из-за его способности стимулировать быст-

рый рост хондроцитов, а полипептидный матрикс – для дальнейшего создания трехмерной структуры, в которой клетки равномерно распределяются по всей толще.

Первые 6 суток культивирования хондроцитов в составе полипептидной пластины отмечалось разнообразие гистоморфологической картины с формированием хондроподобных одиночных мелких очагов. К 10 – 14 суткам происходила окончательная дифференцировка клеток в составе пластины с образованием гиалиноподобных хрящевых скоплений величиной до 2мм.

Параллельный анализ образцов пластины, содержащей хондроциты, окрашенных различными красителями позволяет убедиться в развитии полноценной хондрогенной дифференцировки клеток в специализированные тканевые фрагменты.

Кроме того, иммуногистохимический анализ показал наличие коллагена 2-го типа в матриксе сконструированных тканей, заключенного в лакунах клеток (рис.6).

Таким образом, было установлено, что полипептидный матрикс оказался более эффективным для образования хрящеподобных структур, чем коллагеновый. Хондроциты были равномерно распределены в трехмерном пространстве, не проявляли склонности к дедифференцировке и синтезировали полноценный экстрацеллюлярный матрикс.

Для того чтобы избежать дедифференцировки хондроцитов и стимулировать их пролиферацию мы протестировали ряд вспомогательных веществ: аскорбиновая кислота, инсулин, трансферрин, селенит, фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий ростовой фактор (TGF).

В нашем эксперименте максимально выраженный эффект, позволивший полностью избежать дедифференцировки, оказывало сочетанное использование трансформирующего ростового фактора, аскорбиновой кислоты и трансферрина.

Выводы

1. Наибольшим потенциалом развития обладают культуры хондроцитов, полученные на основе прогениторных фетальных клеток. В то же время клетки зрелой хрящевой ткани относительно стабильны при культивировании в составе кластеризованной культуры.

2. Было установлено, что кроме коллагена, полипептидный матрикс более приемлем для образования хрящеподобных структур. Хондроциты равномерно распределяются в нем, стабильны и не проявляют склонность к дедифференцировке, а синтезируют полноценный экстрацеллюлярный матрикс – новую хрящеподобную ткань.

3. Для поддержания стабильности культуры оправдано использование ростовых факторов и добавок (аскорбиновая кислота, инсулин, трансферрин, селенит, фактор роста фибробластов, трансформирующий ростовой фактор), которые способствуют быстрому росту и пролиферации культуры, а также сохранению стабильного фенотипа.

Литература

1. Almqvist, KF, Wang, L et al. Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks // *Ann Rheum Dis* – 2001; 60:781-790.
2. Baragi, V.M., Renkiewicz, R. R., Jordan, H., Bonadio, J., Hartman, J. W., Roessler, B. J. Transplantation of Transduced Chondrocytes Protects Articular Cartilage from Interleukin 1-Induced Extracellular Matrix Degradation // *The Journal of Clinical Investigation* – 1995; 96(5): 2454-2460.
3. Benya, PD, Shaffer, JD. Dedifferentiated chondrocytes re-express the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels // *Cell*-1982;30:215-24.
4. Brittberg, M, Lindahl, A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation // *N Engl J Med*-1994;331:889-95.
5. Gigante, A., Bevilacqua, C., Zara, C., Travasi, M., Chillemi, C. Autologous chondrocyte implantation: cells phenotype and proliferation analysis // *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc* – 2001; 9:254 – 258.
6. Jin Lu, Ya-Peng Gu, Xia Xu, Mei-Lian Liu, Ping Xie, Hui-Ping Song. Adult islets cultured in collagen gel transdifferentiate into duct-like cells // *World J Gastroenterol*-2005; 11(22):3426-3430.
7. Katsube, K, Ochi, M, Uchio, Y, et al. Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in atelocollagen gel: comparison with cultured chondrocytes in suspension // *Arch Orthop Trauma Surg*-2000;120:121-7.
8. Wakitani, S, Kimura, T, Hirooka, A, et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel // *J Bone Joint Surg (Br)*-1989; 71-B:74-80.