

© Коллектив авторов, 2014
УДК 616.72-018.3-089.843-003.93:636.92

*Л.Т.Волова, Г.П.Котельников, Ю.В.Ларцев, Д.А.Долгушкин, В.В.Болтовская
и М.А.Тертерян*

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ПЛАСТИКЕ КОСТНО-ХРЯЩЕВЫХ ДЕФЕКТОВ КОМБИНИРОВАННЫМИ ТРАНСПЛАНТАТАМИ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ И АЛЛОГЕННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ИЗ РЕБЕРНОЙ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Институт экспериментальной медицины и биотехнологий (дир. — проф. Л.Т.Волова); кафедра травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии (зав. — академик РАН проф. Г.П.Котельников), Самарский государственный медицинский университет

С позиции регенеративной медицины *in vivo* у кроликов оценена эффективность пластики костно-хрящевых дефектов суставной поверхности комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами на основе бионосителя — деминерализованной губчатой кости с аутологичными или аллогенными клетками из рёберной хрящевой ткани. Морфофункциональные характеристики полученных культур клеток изучали с помощью морфологических, гистохимических, иммуногистохимических методов и проточной цитометрии. Клетки имели особенности, характерные для хрящевого дифферона. При сходной макроскопической картине области пластики и отличиях на ранних стадиях гистогенеза после замещения костно-хрящевых дефектов трансплантатами как с аутологичными, так и с аллогенными клетками происходило полноценное восстановление субхондральной кости и гиалинового хряща.

Ключевые слова: *суставной хрящ, костно-хрящевые дефекты, клеточно-тканевый трансплантат, аутологичные и аллогенные клетки*

Одной из актуальных медико-биологических проблем остается посттравматическая регенерация гиалинового суставного хряща. При глубоком полнослойном повреждении дефект суставной поверхности восполняется не в полном объёме плотной соединительной тканью или волокнистым хрящом. Возникшая деформация суставной поверхности приводит к развитию дистрофических процессов в тканях, прилежащих к области дефекта. Проблема усугубляется также тем, что применяемые в настоящее время консервативные и хирургические методы лечения, в том числе и мозаичная пластика с использованием аутологичных костно-хрящевых трансплантатов, завершаются формированием не гиалинового, а волокнистого хряща [3, 10].

Именно уникальность структурной организации и трофики суставного гиалинового хряща, прежде всего, ориентирована на выполнение его

основной функции — опоры и движения; отсутствие сосудов, нервов и камбия надхрящницы определяют низкий регенераторный потенциал этого вида хрящевой ткани и возможность её восстановления в критических ситуациях только на уровне и в объёме неполной регенерации [6]. Поэтому для решения этой сложной проблемы фундаментальной морфологии и практического здравоохранения необходимы нестандартные подходы. Для замещения дефектов суставной поверхности и транспортировки клеток в область повреждения в настоящее время широко используются различные синтетические и биологические матрицы [8, 9].

Предварительно проведенные экспериментальные исследования на кроликах показали, что без выполнения пластики костно-хрящевых дефектов и при их замещении только биологической матрицей без клеток полноценного восста-

Сведения об авторах:

Волова Лариса Теодоровна (e-mail: csrl.sam@mail.ru), *Болтовская Виолетта Викторовна*, *Тертерян Маргарита Анатольевна*, Институт экспериментальной медицины и биотехнологий, Самарский государственный медицинский университет, 443079, г. Самара, ул. Гагарина, 20;

Котельников Геннадий Петрович (e-mail: info@samsmu.ru), *Долгушкин Дмитрий Александрович* (e-mail: dodipesa@yandex.ru), кафедра травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии, Самарский государственный медицинский университет, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89;

Ларцев Юрий Васильевич, отделение травматологии и ортопедии № 2, Самарский государственный медицинский университет, 443086, г. Самара, пр. Карла Маркса, 165Б

новления тканей не происходит. Это подтверждается как макроскопическими, так и микроскопическими исследованиями. В этом случае дефекты замещались только костно-фиброзными регенератами [1]. Нами предложен новый способ пластики костно-хрящевых дефектов суставной поверхности комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами на основе аллогенной деминерализованной губчатой кости (спонгиозы) и культур клеток из рёберного хряща [4].

Цель данного исследования — иммунофенотипирование и морфофункциональная характеристика клеток, полученных из реберного гиалинового хряща; оценка и сравнение с позиции регенеративной медицины эффективности пластики костно-хрящевых дефектов суставной поверхности комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами на основе бионосителя с аутологичными или аллогенными клетками из гиалинового хряща ребра.

Материал и методы. Работа проведена на базе Самарского государственного медицинского университета в Институте экспериментальной медицины и биотехнологий. Объектом исследования были кролики породы шиншилла ($n=23$) обоего пола в возрасте 9–12 мес, массой — 2,5–3 кг. Все исследования осуществляли в рамках международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Кролики были разделены на 2 экспериментальные группы. Первую группу составили 10 животных, которым проводили пластику дефектов поверхности коленных суставов комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами с аутологичными клетками из реберного гиалинового хряща. Вторая группа включала 13 кроликов, которым пластику дефектов проводили комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами с аллогенными клетками из реберного гиалинового хряща.

Клетки для трансплантации получали в лаборатории культуры клеток и выращивали по методу M. Britberg [7] в модификации в стандартных условиях в термостате Sanyo-Incubator MIR-162 (Sanyo, Япония) при температуре 37 °C в пластиковых культуральных флаконах площадью 25 см² (Orange Scientific, Бельгия). После зарастания дна флакона на 80% клетки пересеивали стандартным способом. После 4-кратного пассирования получали чистую культуру фибробластоподобных клеток. Все манипуляции с клетками проводили в ламинарном боксе абактериальной воздушной среды БАВп-01 Ламинар-С-1,2 (01) II класса биологической защиты (Ламинарные системы, Россия). Нативную культуру изучали, морфометрировали и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа Биолам П – 2–1 (ЛОМО, Россия) при увеличении 100 и 150. Идентификацию клеток проводили с использованием морфологических, гистохимических, морфометрических, иммуногистохимических методов и проточной цитометрии. Для определения функциональных и биологических свойств клеток их окрашивали суданом IV и жировым красным O для выявления включений липидов, по Унна. Для выявления минеральных веществ использовали окраску по Косу, щелочную фосфатазу выявляли по методу Берстона, сукцинатдегидрогеназу (СДГ) — по методу Нахласа, коллаген II типа идентифицировали с

помощью моноклональных антител двухэтапным методом [2] (Chondrex, inc., США). Изучали экспрессию маркеров стромальных клеток (CD44, CD90, CD105) и гемопоэтических клеток (CD34, CD45) методом проточной цитометрии (цитофлюориметр Beckton Dickinson FACSCalibur, США) и иммуногистохимии, используя моноклональные антитела (AbD Seratec, Германия и DAKO Denmark A/S, Дания). Выполняли исследование культур клеток с помощью дифференцировочных сред. Для оценки остеогенной дифференцировки использовали: дексаметазон (10^{-7} М), аскорбат-2-фосфат (50 мг/мл) и β -глицерофосфат (10 мМ). Для оценки хондрогенной дифференцировки использовали: дексаметазон (10^{-7} М), аскорбат-2-фосфат (50 мг/мл) и трансформирующий фактор роста (TGF β 1, 10 нг/мл). Все указанные реактивы — производство Sigma-Aldrich (США).

Деминерализованную губчатую кость кролика получали по технологии «Лиопласт»® (ЛИОСЕЛЛ, Россия) согласно ТУ 9398-00169101571-2011. С целью получения комбинированных клеточно-тканевых трансплантатов бионоситель помещали на 3–4 сут в культуральные флаконы с клетками, выращенными из реберного гиалинового хряща, а затем выполняли пластику дефектов суставной поверхности.

Животных выводили из эксперимента через 2 нед, 1, 3 и 6 мес путем введения им летальной дозы тиопентала натрия. Выполняя артротомию коленных суставов, оценивали макроскопическую картину области пластики. Для гистологического анализа брали дистальный отдел бедренной кости. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в этаноле восходящей концентрации и заливали в парафин. Изготавливали серийные срезы толщиной 5–6 мкм на всю глубину блока на ротормном микротоме Sakura Accu-Cut SRM200 (Sakura Finetek, Япония). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином — эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, кризольным фиолетовым. Препараты изучали на светооптическом уровне с помощью биологического микроскопа Nikon Alphaphot-2 YS2-H (Nikon, Япония), телеметрически при помощи видеокамеры КСС-310PD.

Результаты исследования. При культивировании клеток уже начиная с 3-х суток после эксплантации фрагментов реберного гиалинового хряща в культуральный флакон наблюдали рост клеток. Они проявляли отчетливо выраженную способность к адгезии ко дну флакона, имели удлиненную форму, 3–5 отростков, анастомозирующих с отростками соседних клеток, центрально расположенное ядро с крупными ядрышками. От фибробластов культивированные клетки отличались характером роста на культуральном пластике, размерами и количеством отростков. Контуры клеток были четко очерчены, цитоплазма была светлая по периферии и более темная гомогенная в центральных зонах вокруг ядер. Морфологические исследования показали, что клетки формировали специфические геометрические фигуры, визуально напоминающие остеоны и вставочные пластинки компактной костной ткани (рис. 1).

По морфологическим признакам клетки были расценены как фибробластоподобные, малодиф-

ференцированные. При окраске жировым красным О и суданом IV в их цитоплазме выявлялись мелкие включения нейтрального жира. Эти клетки были способны синтезировать коллаген II типа, реакция на щелочную фосфатазу в них была отрицательная. Фенотипирование культивируемых клеток с помощью проточной цитометрии и иммуногистохимии показало принадлежность этих клеток к стромальным, об этом свидетельствовала экспрессия маркеров CD44, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии на их поверхности маркеров гемопоэтических клеток CD34, CD45.

После использования дифференцировочных сред культивирование клеток продолжалось в течение 3 нед, после чего для оценки остеогенной дифференцировки использовали окраску по Коссу, не выявившую минеральных отложений.

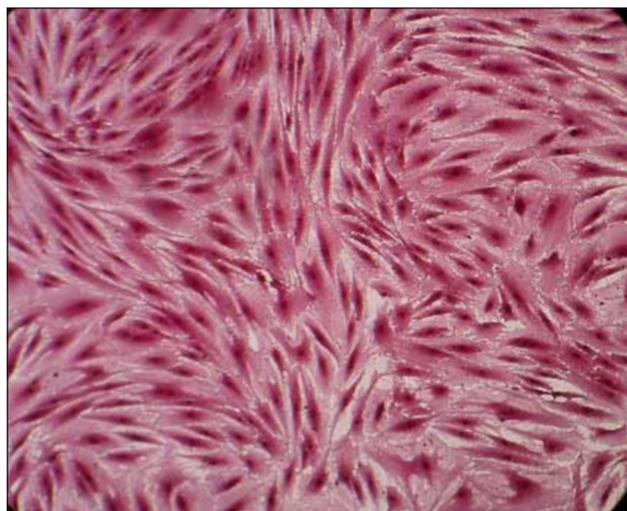


Рис. 1. Культура фибробластоподобных клеток из аллогенного гиалинового реберного хряща. Окраска по Унна. Об. 10, ок. 10

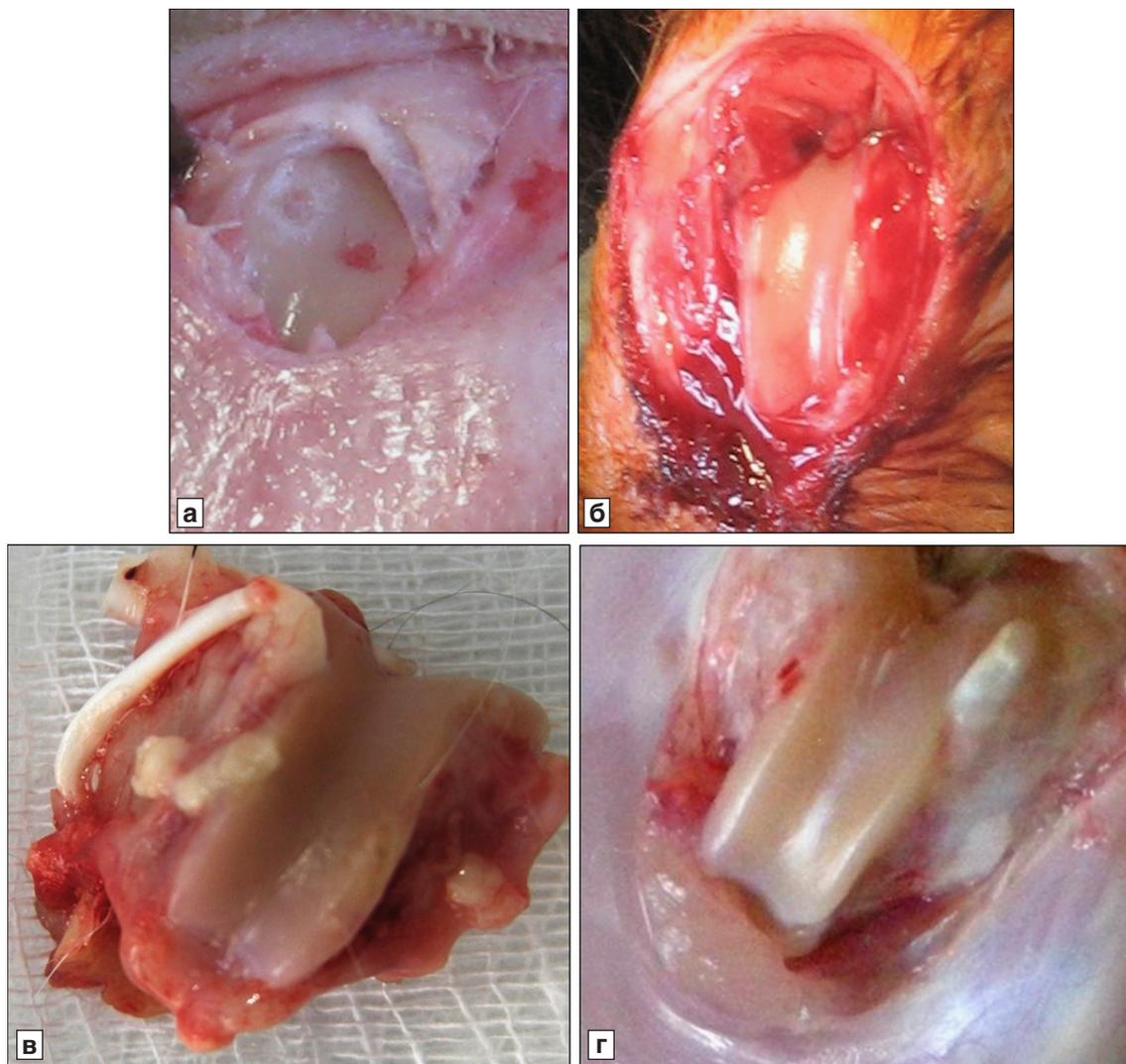


Рис. 2. Макроскопическая картина области пластики дефектов поверхности коленных суставов кролика комбинированными трансплантатами.

а — 2 нед после операции — трансплантаты полностью восполняют объем дефектов; б — 1 мес после операции — область пластики еще видна, но площадь дефекта значительно уменьшена; в — 3 мес после операции, дефекты не видны; г — 6 мес после операции — суставная поверхность без деформации, гладкая, блестящая, бело-голубого цвета

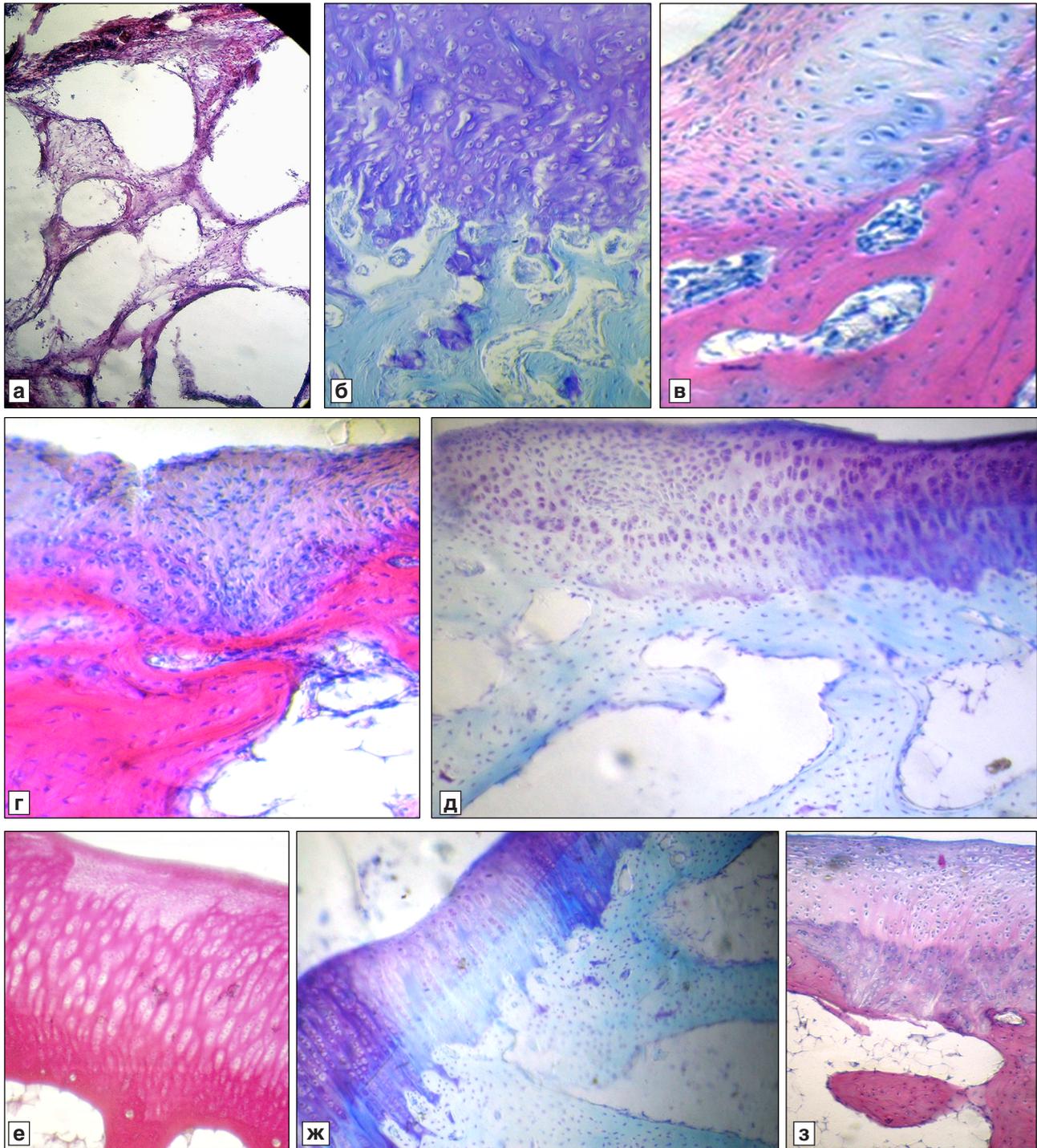


Рис. 3. Результаты пластики дефектов поверхности коленных суставов кролика комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами с аллогенными (а, в, д, ж) и аутологичными (б, г, е, з) клетками реберного хряща.

а, б — 2 нед после операции: а — пористый трансплантируемый материал, б — между круглыми клетками располагаются фрагменты балок рассасывающегося трансплантата; в, г — 1 мес после операции: в — незрелые клетки, формирующие группы, поверхностный слой с плоскими клетками, г — мелкие хондроциты, не образующие групп; д, е — 3 мес после операции, поверхность области регенерата ровная, в наружном слое скопления мелких плотно расположенных круглых клеток; ж, з — 6 мес после операции — восстановленный гиалиновый хрящ с характерной для него зональностью. а, в, г, е, з — окраска гематоксилином—эозином; б, д, ж — окраска крезильовым фиолетовым. Об. 10, ок. 10

Клетки давали положительную реакцию на сульфатированные гликозаминогликаны, что указывает на их хондрогенную дифференцировку.

Все это свидетельствует, что фибробластоподобные клетки, выращенные из реберного хряща,

являются прогениторными клетками хрящевого дифферона.

При макроскопическом исследовании зоны пластики дефектов комбинированными трансплантатами как с аутологичными, так и с аллогенными

клетками из реберной хрящевой ткани в динамике не отличались друг от друга. Трансплантаты полностью восполняли объём дефекта. Начиная с 3-го месяца, суставная поверхность области пластики в обеих группах не отличалась от окружающего гиалинового хряща — была гладкой, блестящей, бело-голубого цвета (рис. 2, а–г).

Различия гистогенеза в области пластики дефектов комбинированными трансплантатами с разными типами клеток наблюдали только в ранние сроки. Так, через 2 нед у кроликов, которым выполняли пластику дефектов комбинированными трансплантатами с аллогенными клетками реберного гиалинового хряща, в серийных срезах определялся пористый трансплантируемый материал (рис. 3, а), тесно спаянный с окружающими тканями. Прослеживались контуры рассасывающихся трабекул пересаженной деминерализованной губчатой кости, все пространство которых было заполнено большим количеством фибробластоподобных клеток. Клетки были продолговатой формы с 2–3 отростками, с центрально расположенным округлым ядром и хорошо окрашивающейся цитоплазмой. После пластики трансплантатами с аутологичными клетками реберного гиалинового хряща в этот же срок была отмечена полиморфная картина. Объём дефекта полностью заполняла ткань, представленная большим количеством круглых клеток с центрально расположенным ядром, находящихся в состоянии спонтанной хондродифференцировки. Между круглыми клетками располагались небольшие фрагменты балок рассасывающегося трансплантата (см. рис. 3, б). В глубоких зонах регенерата наблюдалась активная остеобластическая реакция.

Через 1 мес после выполнения пластики дефектов комбинированными трансплантатами с аутологичными клетками поверхность регенерата плавно переходила в прилежащий гиалиновый хрящ. Преобладали многочисленные отдельно расположенные мелкие хондроциты, которые не образовывали групп (см. рис. 3, г). В глубоких слоях формировалась грубоволокнистая костная ткань. После пластики трансплантатами с аллогенными клетками область регенерата отличалась полиморфной многоклеточной картиной. Было обнаружено большое количество незрелых клеток, часть которых, более крупные, формировали группы. Поверхностный слой был представлен плоскими клетками, располагающимися в виде пласта (см. рис. 3, в). Наблюдалась регенерация и формирование грубоволокнистой костной ткани с большим количеством кровеносных сосудов микроциркуляторного русла.

Через 3 мес после пластики дефектов комбинированными трансплантатами в обеих группах животных было отмечено полное восстановление объёма дефектов тканью регенерата. Поверхность области регенерата была ровная. В наружном слое определялись скопления мелких плотно расположенных круглых клеток (хондроид) (см. рис. 3, д, е). Вокруг таких скоплений обнаруживались более крупные клетки. Зонального строения хрящевой ткани ещё не прослеживалось, но уже определялась будущая линия разделения хряща на кальцифицированный и некальцифицированный. Кальцификации глубокого слоя хряща еще не происходило. В субхондральной кости формировалась губчатая костная ткань. Широкие межтрабекулярные лакуны были заполнены костным мозгом.

Спустя 6 мес после пластики дефектов комбинированными трансплантатами регенерация была завершена в обеих группах животных — отмечено органотипичное восстановление гиалинового хряща с характерной зональностью его строения, разделением базофильной линией на слой кальцинирующегося и некальцинирующегося хряща (см. рис. 3, ж, з). В зоне, граничащей с субхондральной костью, хрящевые клетки были крупными, круглыми, матрикс был обызвествлен. Субхондральная пластинчатая костная ткань была сформирована.

Обсуждение полученных данных. В ряде исследований показано, что для замещения дефектов суставной поверхности целесообразно использовать клетки из гиалинового хряща, сохранившие свой регенераторный фенотип, способные продуцировать межклеточное вещество, включающее коллаген II типа. Источником получения таких клеток служил суставной хрящ, что приводило к дополнительной травме суставной поверхности [5, 10].

В нашем наблюдении клетки получали не из суставного, а из реберного хряща, используя гетеротопический принцип взятия клеточного материала. В культуре эти клетки имели фибробластоподобную форму с 2–3 отростками, жировые включения в цитоплазме, продуцировали коллаген II типа. При использовании дифференцировочных сред они подвергались хондрогенной, а не остеогенной дифференцировке; давали положительную реакцию на маркеры стромальных клеток CD44, CD90, CD105 и не давали реакции на маркеры гемопоэтических клеток CD34, CD45. Всё это позволило идентифицировать их как прогениторные клетки хрящевого дифферона.

В качестве носителей для клеток используют разнообразные материалы как биологического,

так и синтетического происхождения [6, 8, 9, 11]. В нашем исследовании была применена биорезорбируемая матрица — деминерализованная губчатая кость, так как мы считаем роль носителя очень важной не только для доставки клеток, но и для восполнения объема дефекта, восстановления анатомической целостности суставной поверхности, пролиферации клеток и формирования в дальнейшем органотипичного гиалинового хряща и субхондральной кости.

Сравнительный морфологический анализ области пластики дефектов комбинированными трансплантатами на основе биологической матрицы как с аутологичными, так и аллогенными клетками хрящевой ткани ребер показал, что при различиях в морфологической картине на ранних стадиях гистогенеза к завершению эксперимента в обеих экспериментальных группах происходило восстановление органотипичной структуры как субхондральной кости, так и суставного гиалинового хряща. При этом макроскопическая картина зоны пластики в обеих группах животных была сходной.

Таким образом, заполнение костно-хрящевых дефектов суставной поверхности комбинированными трансплантатами на основе деминерализованной спонгиозы как с аутологичными, так и с аллогенными клетками из реберной хрящевой ткани обеспечивает формирование *de novo* органотипичного суставного гиалинового хряща и субхондральной кости. Успешное использование аллогенного клеточного материала, сравнимое с применением аутохондроцитов, даёт возможность создания в будущем банков инновационных клеточно-тканевых продуктов для лечения пациентов с посттравматическими костно-хрящевыми дефектами крупных суставов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Котельников Г.П., Волова Л.Т., Тертерян М.А. и Долгушкин Д.А. Морфологические результаты пластики посттравматических дефектов суставной гиалиновой хрящевой ткани разными видами трансплантатов в эксперименте. *Морфол. ведомости*, 2013, № 3, с. 62–67.
2. Лойда З., Госсрау Р. и Шиблер Т. *Гистохимия ферментов*, М., Мир, 1982.
3. Маланин Д.А., Писарев В.Б. и Новочадов В.В. Восстановление поврежденных хряща в коленном суставе: экспериментальные и клинические аспекты. Волгоград, Волгоградск. научное изд-во, 2010.
4. Патент РФ № 2383310. Способ восполнения дефектов суставного хряща. Г.П.Котельников, Л.Т.Волова, Ю.В.Ларцев,

В.В.Росинская, Д.А.Долгушкин. Заявка № 2008149207 от 12.12.2008 г. Опубл. в БИ, 2010, № 7.

5. Barlic A., Drobnic M., Malicev E. et al. Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation. *J. Orthop. Res.*, 2008, v. 26, № 6, p. 847–853.
6. Becerra J., Andrades J.A., Guerado E. et al. Articular cartilage: structure and regeneration. *Tiss. Eng Part B Rev.*, 2010, v. 16, № 6, p. 617–627.
7. Brittberg M., Nilsson A., Lindahl A. et al. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1996, v. 326, p. 270–283.
8. Filardo G., Kon E., Roffi A. et al. Scaffoldbased repair for cartilage healing: a systematic review and technical note. *Arthroscopy*, 2013, v. 29, № 1, p. 174–186.
9. Gille J., Behrens P., Volpi P. et al. Outcome of autologous matrix induced chondrogenesis (AMIC) in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 2013, v. 133, № 1, p. 87–93.
10. Tetteh E.S., Bajaj S. and Ghodadra N.S. Basic science and surgical treatment options for articular cartilage injuries of the knee. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 2012, v. 42, № 3, p. 243–253.
11. Zanasi S., Brittberg M. and Marcacci M. Basic Science, Clinical Repair & Reconstruction of Articular Cartilage Defects: Current Status and Prospects. Bologna, Timeo Editore SRL, 2006.

Поступила в редакцию 30.05.2014
Получена после доработки 05.06.2014

PECULIARITIES OF REGENERATIVE PROCESSES AFTER THE PLASTY OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS WITH COMBINED CELL-TISSUE GRAFTS ON THE BASIS OF AUTOLOGOUS AND ALLOGENEIC CELL CULTURES FROM COSTAL CARTILAGE TISSUE

L.T.Volova, G.P.Kotel'nikov, Yu.V.Lartsev, D.A.Dolgushkin, V.V.Boltovskaya and M.A.Terteryan

From a position of *in vivo* regenerative medicine, the efficacy of plasty of osteochondral defects of the articular surface was evaluated in rabbits. The combined cell-tissue grafts were used with the demineralized spongy bone as a biomatrix and autologous or allogeneic cells from the rib cartilage tissue. Morphofunctional characteristics of the cell cultures obtained were studied using morphological, histochemical, immunohistochemical and flow cytometric methods. Cells had features typical to cartilage cell line. While the macroscopic appearance of the plasty area was similar, some differences of histogenesis were observed at the early stages after the placement of transplants containing autologous as well as allogeneic cells, into the osteochondral defect area. In both cases, the complete recovery of subchondral bone and hyaline cartilage took place.

Key words: *articular cartilage, osteochondral defects, cell-tissue graft, autologous and allogeneic cells*

Institute of Experimental Medicine and Biotechnologies, Department of Traumatology, Orthopedics and Extremal Surgery, Samara State Medical University