

УДК 611.711.018.3.018.1

Культура клітин міжхребцевого диска людини

С.В. Малишкіна, О.М. Костицька,
Л.М. Бенгус, І.В. Вишнякова

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка АМН України», Харків

The authors studied a possibility to cultivate cells, isolated from fragments of intervertebral disks, which were removed in patients in the process of reparative-restorative operations on the vertebral column for osteochondrosis. An analysis of the structure of intervertebral disk fragments is presented. Proliferative and biosynthetic abilities of cultured cells were studied with purpose of their use for repairing damaged inter-

Исследована возможность культивирования клеток, извлеченных из фрагментов межпозвонковых дисков, удаленных у пациентов при выполнении реконструктивно-восстановительных операций на позвоночнике по поводу остеохондроза. Представлен анализ структуры фрагментов межпозвонковых дисков. Изучена пролиферативная и биосинтетическая способность культивированных клеток с целью их использования в репарации поврежденного межпозвонкового диска.

Ключові слова: міжхребцевий диск людини, клітини, культивування, цитологія

Вступ

У складній структурі уражень хребта значне місце посідає патологія міжхребцевого диска [5, 23]. Останнім часом у регенеративну медицину міжхребцевого диска активно впроваджуються методи тканинної та клітинної інженерії. Вивчається можливість застосування для стимуляції його регенерації культивованих аутологічних та алогенних клітин хрящового диферону, міжхребцевого диска та мезенхімальних клітин [7, 9, 13]. Використання культивованих клітин для трансплантації пов'язано з вирішенням низки питань, які так чи інакше впливають на кінцевий результат. Насамперед, це вибір методики вилучення клітин, віку донора, адекватного джерела клітин, типу клітин тощо.

Мета роботи — дослідження культивованих клітин міжхребцевих дисків, видалених у пацієнтів під час реконструктивно-відновлювальних операцій на хребті.

Матеріал і методи

Клітини для культивування було вилучено із фрагментів міжхребцевих дисків (гриж), видалених під час проведення реконструктивно-відновлювальних операцій на хребті у пацієнтів із остеохондрозом. Клітини із міжхребцевих дисків

вилучали згідно з методикою [2] та культивували за методом культури високої щільності [1]. Для дослідження фрагментів міжхребцевих дисків використовували гістологічні методи [6]. Культивовані клітини досліджували на 5 та 9 добу за допомогою цитологічних (забарвлення азур-еозином) [3], гістологічних (забарвлення гістологічних зрізів гематоксиліном та еозином, а також толуїдиновим синім) [4] та електронно-мікроскопічних методів (контрастування ультратонких зрізів за Рейнольдсом і забарвлення альціановим синім (8GS) для дослідження глікозаміногліканів).

Результати та їх обговорення

Морфологічні особливості структурної організації фрагментів міжхребцевих дисків (гриж) оперованих пацієнтів. Фрагменти міжхребцевих дисків (гриж) були представлені як ділянками лише драглистого ядра, так і драглистого ядра і волокнистого кільця сумісно. Фрагменти міжхребцевих дисків мали нерівномірні контури та забарвлення матриксу: подекуди виявлялись ділянки вираженої базofilії. По крайовій поверхні фрагментів спостерігались глибокі тріщини, матрикс був гомогенним, подекуди — розшарованим, з невеликими тріщинами (рис. 1 а). Щільність клітин хрящового

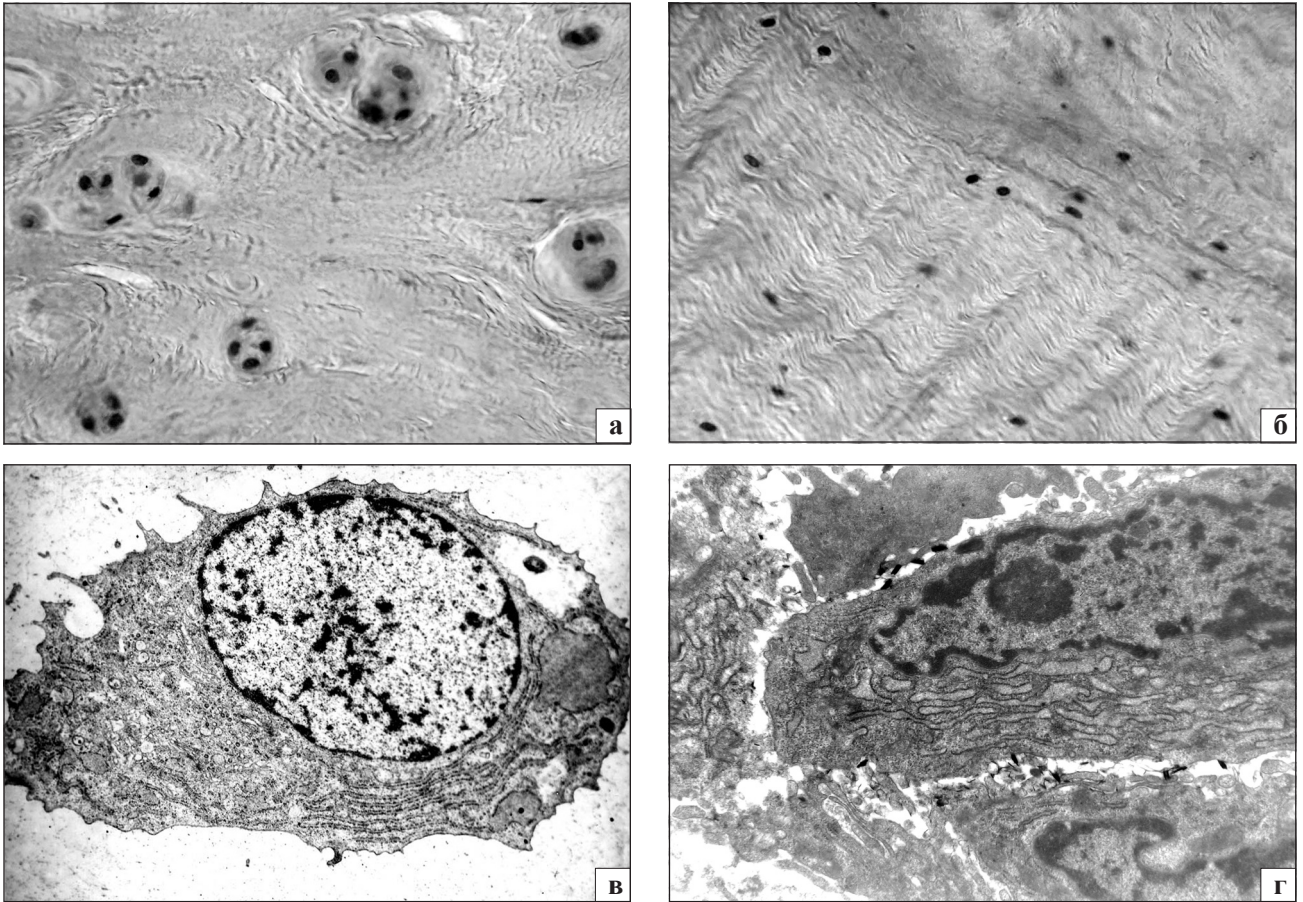


Рис. 1. Микрофото: а) ділянка драглистого ядра міжхребцевого диска (пацієнт К.). Нерівномірність забарвлення матриксу та щільності клітин хрящового диферону. Осередки розшарування матриксу; б) фрагмент міжхребцевого диска представлений волокнистим кільцем (пацієнт Д.). Осередки базофілії та розшарування матриксу. Нерівномірна щільність клітин. Гематоксилін та еозин. Зб. 200. Фото електронограм: в) клітина хрящового диферону з добре розвинутою ендоплазматичною сіткою. Контрастовано за Рейнольдсом. Зб. 13340; г) клітина фібробластичного диферону зі значною щільністю мембранних органел. Контрастовано за Рейнольдсом. Зб. 14890

диферону по території фрагментів була різною — від 20 до 45 клітин (зб. 200), проте були відмічені і ділянки без клітин. Виявлялись поодинокі клітини фібробластичного диферону, деінде розташовувались невеликі ізогенні групи (2–5 клітин) хондроцитів. Більшість клітин були великими, з добре означеним, переважно гіпохромним ядром. Лише деякі клітини мали пікнотичні ядра. Подекуди, по краю фрагментів, відмічали проліферати клітин фібробластичного диферону.

Клітинний склад фрагментів волокнистого кільця був представлений, в основному, фіброхондроцитами (рис. 1 б). У матриксі фрагментів виявлялись тріщини, розшарування пучків колагенових волокон, нерівномірне забарвлення. У полі зору було від 13 до 35 клітин видовженої форми із невеликим більш щільним ядром.

Під час електронно-мікроскопічного дослідження видалених фрагментів визначали клітини як фібробластичного, так і хондробластичного диферонів. Ультраструктурна організація клітин

була різною щодо наявності клітинних органел. Переважна більшість клітин мала характерну для норми ультраструктурну організацію. Такі клітини містили великі ядра з еухроматином, а у цитоплазмі — добре розвинуту ендоплазматичну сітку з розширеними подекуди каналцями та рибосомами (рис. 1 в, г). Лише у деяких клітинах було відмічено щільні пікнотичні ядра, бідну на мембранні органили цитоплазму, в якій виявлялись вакуолі, лізосоми та деструктивні мембранні органили.

Тобто, за наявних деструктивних змін у фрагментах міжхребцевих дисків оперованих пацієнтів їх клітинний склад (за фенотипом) відповідає складу клітин у нормі, а ультраструктурна організація переважної більшості клітин вказує на їх життєздатність та наявність клітинних органел, котрі здатні забезпечити характерний для даних клітин біосинтез. Це свідчить про позитивну можливість їх культивування та одержання під час нього приросту клітин.

Цитологічні особливості культивованих клітин людини, вилучених із фрагментів міжхребцевих

дисків (гриж). На 5-у добу культивування виявлявся тонкий пласт клітин, який займав майже половину поверхні скельця. По території пласта у ділянках висіву клітин, розташовувались їх щільні скупчення. За морфологічними ознаками клітини поза скупченнями мали овальну та видовжену форму із чітко визначеним ядром середніх розмірів, овальної форми. Цитолема та каріолема клітин також чітко визначались. Хроматин ядра був гіпохромним. У ядрі практично кожної клітини виявлялись великі ядерця. Об'єм цитоплазми, яка мала гомогенний вид, був у 2–3 рази більшим за територію ядра (рис. 2 а, б). Клітини контактували між собою невеликими відростками цитоплазми. За фенотипом такі клітини можна було віднести до фіброхондробластів. По території пласта відмічено клітини на різних стадіях мітозу (рис. 2 а, б). Мітотичний індекс становив — 14%.

Клітини у скупченні були, переважно, округлої форми із гіпохромним округлим ядром, розташованим у центрі клітини. Облямівка цитоплазми була незначною. Клітини щільно контактували між собою, місцями виявлялось нашарування клітин у два-три шари. Такі клітини за фенотипом були віднесені до клітин хрящового диферону. Кількість клітин, знятих з одного скельця становила $7,12 \times 10^5 \pm 0,47 \times 10^5$. По периферії пласта спостерігались і деструктивні клітини (з нечітко визначеним або пікнотичним ядром та вакуолізованою цитоплазмою). Їх налічувалось $0,48 \times 10^5 \pm 0,029 \times 10^5$ (6,8%).

Під час електронно-мікроскопічного дослідження ультраструктурної організації клітин було встановлено, що у цитоплазмі переважної більшості клітин виявлялась добре розвинута ендоплазматична сітка як гранулярного, так і агранулярного типів.

Окремі цистерни ендоплазматичної сітки були розширені. Деякі клітини містили комплекс Гольджі зі значною кількістю секреторних пухирців. В ядрах клітин переважав еухроматин, що є відбитком їх підвищеної функціональної активності.

На 9-у добу культивування клітинний пласт розташовувався на всій території скельця, а клітинні скупчення збільшились у розмірі і займали майже третину площі клітинного пласта. Щільність клітин у скупченнях була значною. На скельцях неможливо було визначити фенотип та структуру клітин, бо вони розташовувались у декілька рядків. Такі скупчення клітин були механічно (обережно) зняті зі скельця і підготовлені для гістологічного дослідження (рис. 2 в), під час якого було виявлено, що пласт клітин складався із 4–7 шарів. Переважна більшість клітин мала невеликі розміри, були округлої форми з гіпохромним центрально розташованими ядрами. Клітини щільно контактували між собою. Після забарвлення толуїдиновим синім відмічено яскраву метахромазію не тільки в цитоплазмі клітин, але й у міжклітинному просторі, що свідчить про наявність глікозаміногліканів. Це підтверджувалось і в процесі електронно-гістохімічного дослідження клітинних скупчень. У цитоплазмі клітин розташовувались численні цистерни гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, вільні рибосоми та полісоми (рис. 3 а). У ядерній мембрані частини клітин виявлялись численні пори, а у цитоплазмі — поодинокі мітохондрії та невеликі крапельки глікогену, що свідчить про хрящовий фенотип клітин. Забарвлення альціановим синім дозволило виявити у цитоплазмі та у позаклітинному оточенні гранули глікозаміногліканів (рис. 3 б). Належність клітин до хрящового диферону розглядається нами як пози-

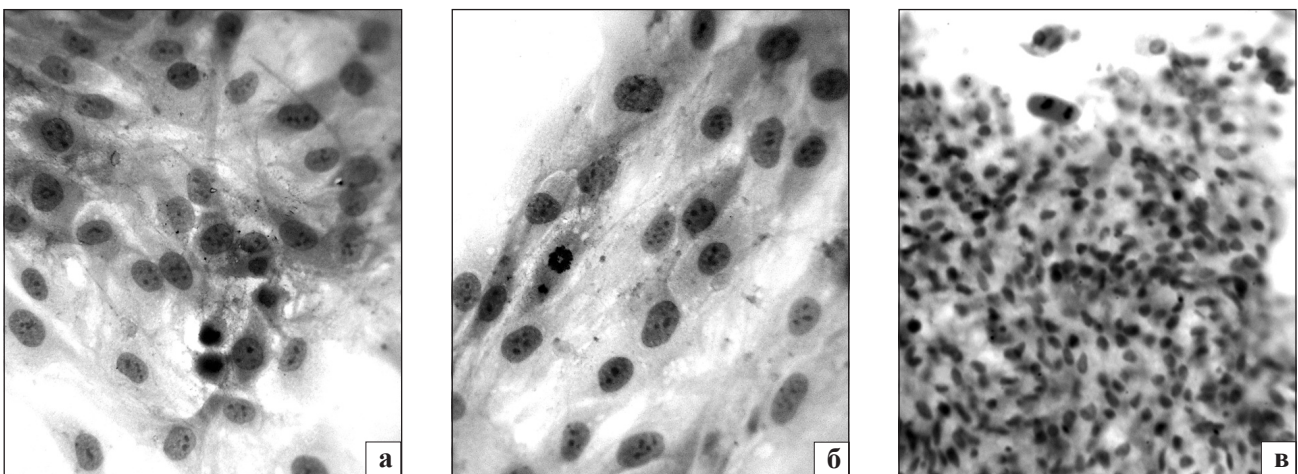


Рис. 2. Мікрофото культур клітин міжхребцевого диска: а) пацієнт Д.; б) пацієнт К. Клітини з фігурами мітотичного поділу. 5-а доба культивування. Азур-еозин. Зб. 400; в) гістологічний зріз культивованих клітин пацієнта Д. 9-а доба. Гематоксилін та еозин. Зб. 200

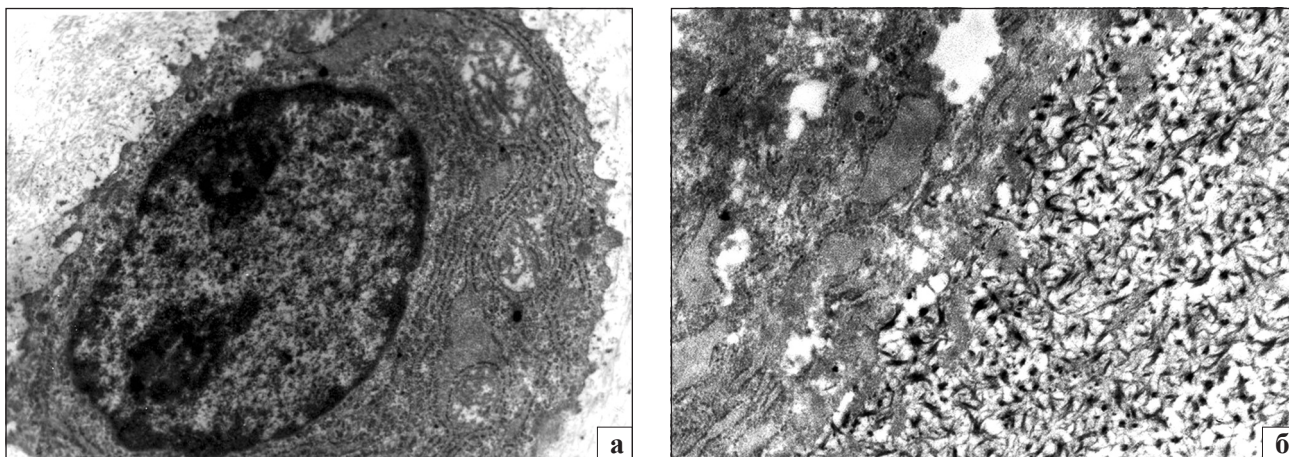


Рис. 3. Мікрофото: а) хондробласт із культури клітин пацієнта Д. Розвинута ендоплазматична сітка з розширеними цистернами. 3б. 15650; б) гранули глікозаміногліканів у позаклітинному матриксі. Розширені цистерни ендоплазматичної сітки у цитоплазмі клітини. 3б. 17540. Контрастовано за Рейнольдсом

тивне явище, бо клітини хрящового диферону можуть забезпечити міжхребцевий диск як достатньою кількістю протеогліканів, так і колагену II типу. Саме такі макромолекули необхідні для формування повноцінно функціонуального матриксу міжхребцевого диска, на що вказують і дослідження інших авторів [12, 20].

Клітини і на цьому етапі дослідження продовжували ділитися, про що свідчить наявність клітин з фігурами мітозу. Мітотичний індекс трохи зменшився при порівнянні з 5-ю добою і становив 11%. Були виявлені і клітини у стані апоптозу — цитолема таких клітин виглядала грубою широкою смугою, а у цитоплазмі виявлялась зернистість або вакуолі. Ядра клітин були малими, з ущільненою мембраною. Проте кількість таких клітин (12%) не перевищувала числа деструктивних, дозволених для первинних культур. Загальна кількість клітин, знятих з одного скельця, становила $8,45 \times 10^6 \pm 0,67 \times 10^6$. Тобто у випадку висівної концентрації на одне скельце 1×10^5 клітин, одержуємо з одного скельця у 80 разів більшу кількість клітин.

Переважає більшість літературних джерел щодо культивування клітин міжхребцевого диска стосується вивчення клітин експериментальних тварин. При цьому найчастіше використовуються клітини волокнистого кільця міжхребцевих дисків кроликів [20] та бика [15] було встановлено, що вони зберігають життєздатність, високі темпи проліферації та біосинтетичної активності, синтезуючи глікозаміноглікани та колаген I та II типів. Щодо культивування клітин драглистого ядра, існують дані, котрі свідчать про їх низьку проліферативну та біосинтетичну активність у об'ємних культурах [8]. Проте у моношаровій куль-

турі клітини драглистого ядра характеризувались високими темпами біосинтезу глікозаміногліканів та колагену I та II типів [11, 21].

Підвищити ефективність культивування клітин міжхребцевого диска ми вважали за можливе саме спільним культивуванням клітин волокнистого кільця та драглистого ядра, приймаючи до уваги встановлені останніми роками дані про наявність у зовнішніх відділах волокнистого кільця поліпотентних клітин, котрі можуть мігрувати у глибокі відділи волокнистого кільця та драглисте ядро і диференціюватися у хрящовому напрямку [10, 19].

З огляду на дослідження культивованих клітин міжхребцевого диска людини, то у переважній більшості наукової літератури наведено дані стосовно клітин міжхребцевих дисків трупів людини, які не мали дегенеративних змін у дисках. Т. Kluba [17] встановив, що культивування в об'ємних культурах клітин волокнистого кільця міжхребцевого диска трупів людини супроводжується не тільки високою проліферацією клітин, але й їх диференціацією у хрящовому напрямку. А у дослідженнях Н. Gruber et al. [14] показано, що формування макромолекул колагену I–III та VI типів спостерігається лише за культивування клітин міжхребцевого диска людини у тривимірних матрицях, а макромолекули хондроїтин- та кератансульфатів було відмічено як у об'ємній, так і у моношаровій культурах.

Відмінним у виконаному нами дослідженні є те, що використані для культивування клітини було вилучено із міжхребцевих дисків пацієнтів, оперованих з приводу остеохондрозу, у міжхребцевих дисках яких було виявлено деструктивні зміни. Деякі автори вважають неможливим культивування клітин, вилучених із міжхребцевих дисків з дегенеративними змінами [16]. Отримані нами результати

щодо вираженої проліферативної активності та їх високого рівня біосинтетичної активності культивованих клітин, вилучених із деструктивно змінених міжхребцевих дисків, співпадають із результатами досліджень S. Stern et al. [22], які вивчали культивовані клітини міжхребцевих дисків, видалених під час хірургічних втручань у хворих на сколіоз та остеохондроз. Впродовж 21-ї доби культивування автори спостерігали високу проліферативну активність (визначену за показниками синтезу ДНК) клітин міжхребцевих дисків. При цьому більш високі показники були характерні для клітин від пацієнтів зі сколіозом. У культурах клітин міжхребцевих дисків цих же хворих було визначено і більш високий рівень оксипроліну. Порівняння вмісту протеогліканів у двох категоріях хворих не встановило різниці — вони були високими. Подібні дані одержав С. Le Maitre [18] у процесі вивчення культивованих клітин міжхребцевих дисків, які було видалено у пацієнтів під час хірургічного втручання. Гістологічне дослідження виявило у міжхребцевих дисках деструктивні зміни. А під час порівняння культури клітин із вказаних та контрольних міжхребцевих дисків (норма) відмінностей у структурній організації клітин після трьох тижнів культивування автор не відзначив [18].

Таким чином, клітини, які вилучено з фрагментів міжхребцевих дисків пацієнтів, оперованих з приводу дегенеративних захворювань хребта, за умов культивування у культурі високої щільності активно ділились, мали переважно хрящовий фенотип, зберігали високу біосинтетичну активність, на що вказує їх ультраструктурна організація та наявність у позаклітинному просторі макромолекул глікозаміногліканів. Відзначено значний приріст клітин за термінами культивування.

Одержані дані свідчать про можливість активного росту і проліферації культивованих клітин у разі їх трансплантації в ушкоджені ділянки міжхребцевого диска для оптимізації процесу його регенерації, що є у подальшому перспективним напрямком дослідження.

Література

1. Культура високого ступеня щільності мезенхімальних клітин скелетогенних тканин ембріонів шурів / Н.В. Дедух, С.В. Малишкіна, І.В. Бадрадінова і ін. // Укр. морфологічний альманах. — 2003. — № 1. — С. 23–27.
2. Малишкіна С.В. Вплив методів вилучення клітин із міжхребцевого диску на їх кількість, стан та проліферативну активність у культурі / С.В. Малишкіна, Л.М. Костицька, В.В. Вельямінова і ін. // Медицина і... — 2007. — № 2 (17). — С. 35–40.
3. Методические рекомендации по криоконсервированию и цитологическому контролю качества культур клеток и фрагментов ткани. — Харьков: НИИ экспериментальной ветеринарии. — 1998. — 27 с.
4. Модииш Л. Принципы поляризационно-оптического анализа в изучении соединительной ткани / Л. Модииш, М. Керн, Н.В. Дедух // Арх. анат. гистол. и эмбриол. — 1985. — Т. 88. — С. 5–12.
5. Продан А.И. Дегенеративные заболевания позвоночника / А.И. Продан, В.А. Радченко, Н.А. Корж. — Т. 2. — Харьков, 2009. — 261 с.
6. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 542 с.
7. Abbushi A. Regeneration of intervertebral disc tissue by resorbable cell-free polyglycolic acid-based implants in a rabbit model of disc degeneration / A. Abbushi, M. Endres, M. Cabraja // Spine. — 2008. — Vol. 33, № 14. — P. 1527–1532.
8. Chiba K. Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate / K. Chiba, G. Andersson, K. Masuda // Spine. — 1997. — Vol. 22. — № 24. — P. 2885–2893.
9. Denaro V. Stem cell therapy for intervertebral disc degeneration / V. Denaro, J.D. Kang, G. Vadala // US Musculoskeletal Review. — 2009. — Vol. 4. — P. 43–46.
10. Feng G. Multipotential differentiation of human annulus fibrosus cells / G. Feng, X. Yang, H. Shang // J. Bone J. Surg. — 2010. — Vol. 92. — P. 675–685.
11. Gan J.C. Intervertebral disc tissue engineering II: cultures of nucleus pulposus cells / J.C. Gan, P. Ducheyne, E.J. Vresilovic // Clin. Orthop. — 2003. — Vol. 411. — P. 315–324.
12. Ganey T. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells. Experiments in a canine model / T. Ganey, W.C. Hutton, T. Moseley // Spine. — 2009. — Vol. 34, № 21. — P. 2297–2304.
13. Gorenssek M. Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes / M. Gorenssek, C. Jaksimovic, N. Kregar-Velikonja // Cell Mol. Biol. Lett. — 2004. — Vol. 2. — P. 363–373.
14. Gruber H.E. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation / H.E. Gruber, E.N. Hanley // BMC Musculoskeletal Disorders. — 2000. — Vol. 1. — P. 24–29.
15. Helen W. Three-dimensional culture of annulus fibrosus cells within PDLLA-BIOGLASS composite foam scaffolds: assessment of cell attachment, proliferation and extracellular matrix production / W. Helen, C.L.R. Merry, J.J. Blaker // Biomaterials. — 2007. — Vol. 28, № 11. — P. 2010–2020.
16. Johannessen W. Nucleus pulposus degeneration and its role in intervertebral disc mechanical function / W. Johannessen // University of Pennsylvania. — 2006. — P. 117–122.
17. Human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype / T. Kluba, T. Niemeyer, C. Gaissmaier, T. Gründer // Spine. — 2005. — Vol. 30, № 24 — P. 2743–2748.
18. Le Maitre C.L. Studies of human intervertebral disc cell function in a constrained in vitro tissue culture system / C.L. Le Maitre, J.A. Hoyland, A.J. Freemont // Spine. — 2004. — Vol. 29, № 11. — P. 1187–1195.
19. Risbud M.V. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc / M.V. Risbud, A. Guttapalli, T.-T. Tsai // Spine. — 2007 — Vol. 32, № 23. — P. 2537–2544.
20. Sato M. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method / M. Sato, T. Asazuma, M. Ishihara // Spine. — 2003. — Vol. 28. — P. 548–553.
21. Sato M. Glycosaminoglycan accumulation in primary culture of rabbit intervertebral disc cells / M. Sato, T. Kikuchi, T. Asazuma // Spine. — 2001. — Vol. 26, № 24. — P. 2653–2660.
22. Stern S. Human intervertebral disc cell culture for disc disorders / S. Stern, K. Lindenhayn, C. Perka // Clin. Orthop. — 2004. — Vol. 419. — P. 238–244.
23. Zigler E. What's new in spine surgery / E. Zigler, S. Boden, P. Anderson // J. Bone Jt. Surg — 2002. — Vol. 84-A, № 7. — P. 1282–1288.