

На правах рукописи

Пономарёв

ПОНОМАРЁВ ИГОРЬ ВЛАДИМИРОВИЧ

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗГОТОВЛЕННЫХ *IN VITRO*
ХОНДРОТРАНСПЛАНТАТОВ ЛОШАДЕЙ**

16.00.02 – Патология, онкология, и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук



Ульяновск – 2008

Работа выполнена в Новосибирском государственном аграрном университете и исследовательском центре по медицинской технике и биотехнологии, Бад Лангензальца, Германия

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Короткевич Ольга Сергеевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Сыч Виталий Федорович
доктор биологических наук, профессор
Любовцева Людмила Алексеевна

Ведущее учреждение: Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Самарская государственная сельскохозяйственная академия

Защита состоится «27» ноября 2008 г в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.278.07 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования Ульяновский государственный университет по адресу: Набережная реки Свияги, 106, корпус 1, аудитория 703.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ульяновского государственного университета, а с авторефератом – на сайте ВУЗа <http://www.uni.ulsu.ru>.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 432000, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, управление научных исследований.

Автореферат разослан «17» октября 2008 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



С.В. Пантелеев

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время ведётся активный поиск оптимальных методов лечения травматологических и дегенеративных повреждений гиалинового хряща коленного сустава. Расширение спектра лечебных мероприятий привело к появлению и развитию нового направления, находящегося на стыке биотехнологии и медицины – тканевой инженерии. В современной ортопедии достаточно широко используются методы тканеинженерного восстановления дегенеративных изменений гиалинового (суставного) хряща такие как: Mosaik-Plastik-Transplantation (MPT), Autologe Chondrocyten Transplantation (ACT) и Matrix Associated Autologous Chondrocyte Transplantation (МАСТ). Два последних метода находят всё большее применение в ветеринарии, в особенности при лечении суставных заболеваний лошадей (Barnewitz et al., 2003; Litzke et al., 2004).

Травмы, а также дегенеративные изменения хряща как следствие реакции сустава на перегрузку играют в развитии остеоартроза (ОА) в случае, например, спортивных лошадей значительно большую роль чем возрастные или инфекционные факторы (Mac Kay-Smith, 1962; Raker et al., 1966; Vachon et al., 1986).

Необходимость создания нового направления регенеративной медицины обусловлена ограниченной возможностью к самовосстановлению гиалинового хряща *in vivo*. Основой метода тканевой инженерии является создание трёхмерных хрящевых трансплантатов в условиях *in vitro* и последующая их имплантация в область поражения поверхности сустава. В качестве клеточного материала для изготовления „инженерных“ хондротрансплантатов используются аутологичные хондроциты, полученные путём биопсии. Изолированные из хрящевой ткани биоптата клетки размножают затем в монослойной культуре до необходимой концентрации, после чего их переводят в трёхмерную форму. Для поддержания пространственной формы существования клеток суставного хряща *in vitro* применяют, как правило, различные резорбируемые матрицы-носители (Sittinger et al., 1994). Их изготавливают либо из синтетических полимеров молочной и/или гликолевой кислот, либо из органических материалов типа коллагена.

Несмотря на многочисленные позитивные свойства, матрицы-носители являются чужеродными агентами в среде, как самого трансплантата, так и всего сустава в целом. Резорбция материалов, из которых состоят матрицы в условиях суставной жидкости, происходит значительно дольше (год и более) чем, к примеру, в костной ткани, а то и вовсе «ограничивается» капсулированием инородного тела. Процесс элиминации компонентов матриц-носителей сопровождается повышением местного иммунитета, в частности, значительным увеличением количества макрофагов. К тому же продукты распада влияют на изменение pH среды как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Необходимо учитывать и тот факт, что все предлагаемые в качестве

У

матриц-носителей препараты, являются коммерческими продуктами и соответственно повышают конечную стоимость лечения.

Исходя из этого, была разработана концепция создания трёхмерных хрящевых трансплантатов лошади без применения матриц-носителей (Popomarev et al., 2004). В основе метода лежит способность клеток гиалинового хряща активно синтезировать компоненты внеклеточного матрикса (коллаген и протеогликаны) в ответ на механическую стимуляцию. С помощью данной методики удалось получить хондротрансплантаты размером до 2 см в диаметре и толщиной до 3 мм, которые по своей природе являются полностью аутологичными пациенту, так как состоят из собственных клеток и продуктов их синтеза. К тому же в процессе культивирования клеток в качестве необходимой добавки к питательной среде используется аутологичная сыворотка крови.

Использование в экспериментах по изучению репарации гиалинового хряща лабораторных мышей и кроликов сыграло важную роль в понимании механизмов хондрогенеза, однако экстраполяция результатов полученных на суставах мелких животных (толщина коленного хряща кролика около 400 мкм) на объекты типа лошади (толщина коленного хряща 3-5 мм), представляется проблематичной. Имеется незначительное количество публикаций по использованию лошади в качестве экспериментального животного (Barnewitz et al., 2003; Litzke et al., 2004), что, по-видимому, объяснимо стоимостью проведения исследований. Исходя из этого, изготовление объёмных (диаметром более 1 см и толщиной 2-4 мм) тканеинженерных конструкторов из хондроцитов лошади и изучение процессов формирования хрящевой ткани в них является актуальной задачей.

В литературе описаны примеры создания хрящевых трансплантатов без применения матриц-носителей (Adamietz et al., 2003; Grogan et al., 2003), но размеры этих конструкторов не превышают 5 мм в диаметре, что является серьёзным ограничением при внедрении данных методов в ветеринарную лечебную практику крупных животных, каковым является лошадь.

Таким образом, учитывая важность проблемы изучения процессов восстановления поврежденных суставного хряща, проведение сравнительного анализа качества хондротрансплантатов, изготовленных по различным методикам в условиях *in vitro*, является актуальной задачей, решение которой имеет не только научный, но и практический интерес.

Цель исследования. Дать сравнительную морфологическую, биохимическую и гистологическую характеристику хондротрансплантатов лошадей изготовленных *in vitro* на основе коммерческих матриц-носителей и альтернативных им трёхмерных хрящевых конструкторов, созданных по оригинальной методике.

В задачи исследования входило:

- изучение морфологических изменений в клеточных популяциях хондроцитов в процессе культивирования трёхмерных конструкций хрящевых трансплантатов *in vitro*;

- исследование особенностей биохимических параметров внеклеточного матрикса, синтезированного хондроцитами коленного сустава лошадей, полученного на коммерческих матрицах-носителях и трёхмерных хрящевых конструктов, созданных по оригинальной методике;

- оценка гистологически выявляемых преобразований в трёхмерных хрящевых конструктах, созданных с применением матриц-носителей или без таковых;

- изучение влияния механического стимулирования на биохимические и гистологические показатели внеклеточного матрикса в тканеинженерных конструктах хондроцитов лошади изготовленных без использования матриц-носителей;

- иммуногистохимический анализ внеклеточного матрикса *de novo* в созданных *in vitro* хондротрансплантатах лошадей.

Научная новизна. Впервые представлен способ изготовления трёхмерных хрящевых трансплантатов лошади без применения синтетических и искусственных матриц-носителей. Показано, что разработанный способ изготовления хондротрансплантатов без применения матриц-носителей является достойной альтернативой и дополнением, существующим инвазивным методам репарации повреждений суставного хряща. Выявлено положительное влияние механической стимуляции на изменение биохимических и гистологических параметров в трёхмерных культурах хондроцитов лошади *in vitro*, что может являться фактором, повышающим адаптацию хрящевого регенерата к условиям сустава *in situ*. В сравнительном аспекте изучены хондротрансплантаты лошадей созданных на основе современных матриц-носителей и тканеинженерных конструктов изготовленных по оригинальной методике. Выявлено, что независимо от природы и структуры материала носителя синтез основных компонентов внеклеточного матрикса происходит на поверхности хондротрансплантата, тогда как глубжележащие участки демонстрируют отсутствие поддержки хондрогенеза в ткани *de novo*. В противоположность результатам на искусственных матрицах-носителях хрящевые конструкты, изготовленные по оригинальной методике, проявляют значительное морфологическое и биохимическое сходство с нативным гиалиновым хрящом.

Практическое значение исследований.

Оценена практическая значимость коммерческих матриц-носителей для использования в ветеринарной практике крупных животных на примере лошадей.

Предложенный способ микрокапельного нанесения суспензии хондроцитов на матрицы-носители и последующего предкультивирования представляет интерес для специалистов медико-биологического профиля, занимающихся проблемами тканевой инженерии гиалинового хряща.

Изменение биохимических и гистологических параметров внеклеточного хрящевого матрикса под влиянием механического воздействия свидетельствует о целесообразности использования данного вида стимуляции трёхмерных клеточных культур в условиях *in vitro* как

подготовительный этап при оперативном способе репарации суставных повреждений.

Использование лошади в качестве модельного животного и полученные результаты позволяют не только расширить спектр лечебных мероприятий в случаях травматических артрозов, например, спортивных лошадей, но и дают возможность применения полученных данных в клинических исследованиях, поскольку коленный сустав лошади наиболее схож по таким параметрам как толщина, площадь и степень нагрузки с аналогичным суставом человека.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Сравнительный анализ морфологических, биохимических и гистологических параметров хрящевых конструкторов, изготовленных по разным методикам.
2. Значимые различия в показателях внеклеточного матрикса *de novo* хондротрансплантатов лошадей изготовленных разными способами, свидетельствуют о целесообразности использования такого фактора как механическая стимуляция в процессе культивирования трёхмерных конструкторов *in vitro*.
3. Способ создания тканеинженерных трансплантатов без применения матриц-носителей является достойной альтернативой существующим методам репарации повреждений суставного хряща.

Апробация. Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались на международной научно-практической конференции "Проблемы развития коневодства и конного спорта в России", Новосибирск, 2003; 11. Heiligenstädter Kolloquium – Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt, Heiligenstadt, Germany, 2003; Conference "Strategies in Tissue Engineering", Würzburg, Germany, June, 2004; 2nd World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, May, 2005; 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, Munich, Germany, August, 2005; региональной научно-практической конференции "Болезни лошадей", Новосибирск, 2006; II международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы животноводства", Новосибирск, 2006; ECM VII Meeting „Cartilage & Joint Repair“, Davos, Switzerland, June, 2006.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения и выводов. Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста, содержит 31 рисунок и 1 таблицу. Библиографический список включает 130 источников.

Автор выражает благодарность всем коллегам лаборатории тканевой инженерии исследовательского центра по медицинской технике и биотехнологии, Бад Лангензальца (Германия), в особенности ассистенткам Даниэле Пауль и Михаэле Нойман за помощь в проведении биохимических и

гистологических исследований. Также автор выражает особую благодарность д.б.н. Кочневой М.Л. и аспиранту Одинцовой Е.С. (Россия) за оказание практической помощи при оформлении и редакции материалов диссертации.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изолирование и культивирование лошадиных хондроцитов в монослое.

Биоптаты хряща были получены из коленных суставов лошадей эвтаназированных по причинам не связанными с суставной патологией. Возраст лошадей на момент эвтаназии составлял от 1 года до 15 лет. Изолирование и культивирование хондроцитов в монослойной культуре проводилось по стандартной методике (Sittinger et al., 1994).

Культивирование хондроцитов в условиях трёхмерных культур. По достижению необходимой концентрации (10–20 млн) клетки трипсинировали и в виде суспензии с помощью микропипетки наносили на соответствующую матрицу-носитель. В качестве матриц в работе использовались два применяемых в ортопедии и апробированные в ветеринарной практике (Barnewitz et al., 2003; Litzke et al., 2004) коммерческих препарата: Ethisorb® (Ethicon, Norderstedt, Germany) и Chondro-Gide® (Geistlich Pharma AG, Schwitzerland). Ethisorb® представляет собой биорезорбируемый композитный синтетический материал, состоящий из полидиаксона (PDS) и полиглактина (PGL – гликолид/лактат-кополимер, известный также, как шовный материал применяемый в хирургии). Микроскопически Ethisorb® выглядит как рыхлая ткань, что позволяет клеточной суспензии легко проникать внутрь и гомогенно распределяться по матрице. Именуемая две поверхности – «гладкую» и «шероховатую» коллагеновая мембрана Chondro-Gide® фирмы Geistlich, является биологическим производным переработки свиного коллагена I и III типов, которая также используется в тканевой инженерии суставного хряща. Культивирование клеток осуществляется на «шероховатой» поверхности мембраны, которая имеет разветвлённую структуру и служит для поддержания и сохранения пространственного фенотипа хондроцитов.

При изготовлении тканеинженерных трансплантатов без применения матриц-носителей использовалась запатентованная оригинальная методика (Popomarev & Wilke, 2004). В основе метода лежит создание так называемой пеллет-культуры, когда клетки в высокой концентрации (30-50 млн.) путём центрифугирования образуют плотный агрегат, который в последующем, посредством механической стимуляции, образует хрящеподобную структуру, характеризующую высоким содержанием компонентов внеклеточного матрикса. Механическая стимуляция проводится мануально с помощью стеклянной палочки необходимых размеров. Время, частота и интенсивность нагрузки определяются индивидуально для каждого конструкта и контролируются визуально. Параметры механической нагрузки возрастают по мере изменения плотности трансплантата.

Культивирование всех видов трёхмерных тканеинженерных конструкторов осуществлялось в 6-ти луночной плате фирмы Sarstedt (Nümbrecht, Germany) при ежедневной смене культуральной среды.

Морфологические, биохимические, гистологические и иммуногистохимические исследования. По окончании сроков культивирования (3-4 недели) хондротрансплантаты фиксировались для биохимических, гистологических и иммуногистохимических исследований. Анализ морфологических изменений тканеинженерных хрящевых конструкторов осуществлялся с помощью фазово-контрастного микроскопа Leica DM-IL (Fa. Leica, Wetzlar, Germany).

Для проведения биохимических анализов образцы всех тканеинженерных конструкторов обезжировались и обезвоживались в батарее ацетон – ацетон: эфир – эфир, после чего определялось содержание основных компонентов внеклеточного матрикса – протеогликанов и коллагена. Для количественного анализа протеогликанов использовалась фотометрическая реакция с 1,9-диметилметиленовым голубым, специфически выявляющая кислые (сульфатированные) гликозаминогликаны: кератансульфат и хондроитин-6-сульфат, ответственных за амортизационные свойства хряща (Farndale et al., 1986). Количественный анализ коллагена проводился также фотометрически с высушенными солянокислыми гидролизатами проб. Были проанализированы коллагенспецифические аминокислоты гидроксипролин и гидроксипролин-лизин (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1978). Контролем при сравнительных анализах различных конструкторов хондротрансплантатов служил нативный суставной хрящ лошадей.

Для гистологического анализа пробы фиксировались 24 часа в 4% - ом нейтрально забуференном формалине с последующим высушиванием в батарее спиртов восходящей концентрации. Оценка компонентов внеклеточного матрикса и общей морфологии исследуемых тканеинженерных конструкторов проводилась на парафиновых срезах толщиной 7 мкм. Для выявления коллагена использовалось окрашивание по Массону, протеогликанов определяли алциановым синим. Для изучения общей морфологической картины применяли метакроматический краситель толуидиновый синий. Иммуногистохимический анализ для коллагена II-го типа и кислых гликозаминогликанов проводился на аналогичных парафиновых срезах.

Полученные результаты количественных анализов обрабатывали методами параметрической статистики при помощи пакета прикладных программ Microsoft Excel 7,0 (USA) для Windows 98. Для оценки достоверности разности между средними значениями двух групп использовали *t*-критерий Стьюдента при условии нормального распределения объектов в выборке. При малом числе значений в выборках пользовались критерием согласия Колмогорова-Смирнова (Васильева Л.А., 2004). Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ морфологических изменений тканеинженерных хрящевых конструкторов

В процессе культивирования тканеинженерных хрящевых конструкторов отмечались значительные морфологические изменения на клеточном и межклеточном уровне, которые регистрировались с помощью микроскопа или визуально.

3.1.1 Морфологические изменения мембраны Chondro-Gide®

Мембрана является оптически непрозрачной структурой поэтому наблюдения с помощью микроскопа были невозможны и проводились визуально по изменению общей морфологии объекта. Под микроскопом контролировалось качество «прививки» хондроцитов на волокнистую сторону мембраны, а именно: отмечался смыв клеток с матрицы и переход их в монослой после добавления культуральной среды в лунку. Применение микрокапельного метода нанесения суспензии на носитель (5-10 мкл) позволило свести потери клеточного материала к минимуму.

После трёхнедельного культивирования отмечалась незначительная контрактура края мембраны, что можно объяснить размягчением структурных компонентов самой мембраны в процессе культивирования, а также деформирующими изменениями, вызванными созреванием внеклеточного матрикса *de novo*.

3.1.2 Морфологические изменения на матрице Ethisorb®

При нанесении клеточной суспензии на матрицу отмечался больший, чем в случае с мембраной Chondro-Gide®, смыв клеток, что объясняется наличием довольно крупных пор в носителе. На рис. 1а показана начальная стадия трёхмерного роста клеток (отмечено тонкой стрелкой) между волокнами носителя (толстая стрелка), а на рис. 1б – процессы происходящие через 7-10 дней культивирования. Отчётливо видно заполнение пространства матрицы-носителя вновь синтезированным клеточным материалом.

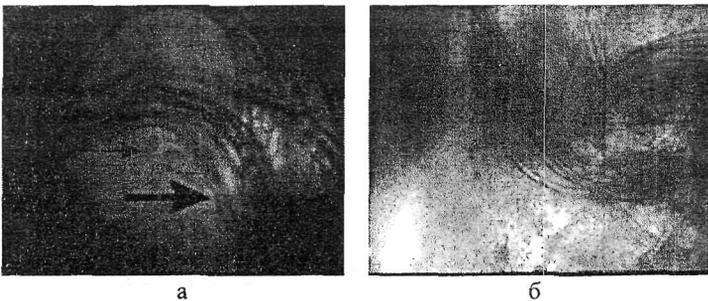


Рис.1 Морфологические изменения на матрице Ethisorb® (фазово-контрастная микроскопия, увеличение: а - $\times 200$; б - $\times 100$).

3.1.3 Морфологические изменения трёхмерных конструкций изготовленных без использования матриц-носителей

3.1.3.1 Субклеточные изменения трёхмерных конструкций

После формирования клеточного агрегата и проведения механической стимуляции отмечаются значительные, регистрируемые под микроскопом морфологические преобразования поверхностных структур тканеинженерного хрящевого конструкта без матрицы-носителя (ТХКБМН). На рис. 2а отмечаются отдельные, чётко различимые агрегированные клетки до начала проведения механического воздействия. На рис. 2б видны изменения произошедшие с конструктом после двукратно проведённого механического стимулирования. Практически неразличимые, погружённые в плотный матрикс, отдельные клетки после семикратного механического воздействия представлены на рис. 2в.

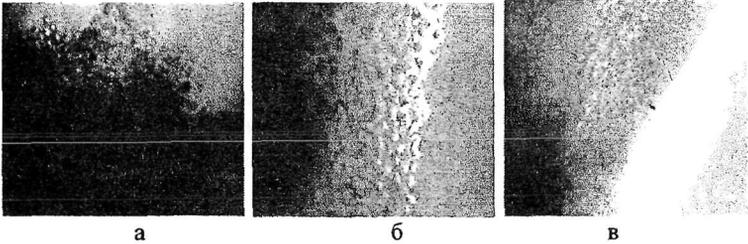


Рис. 2. Субклеточные изменения поверхности клеточного агрегата (фазовый контраст, $\times 100$)

3.1.3.2 Макроскопическая оценка хондротрансплантатов

На рис. 3 демонстрируется внешний вид хрящевых конструктов без матриц-носителей, изготовленных при использовании механической стимуляции в качестве фактора формирования трёхмерной структуры. Были получены трансплантаты 3-4 мм толщиной, с плотностью позволяющей производить необходимые трансплантационные манипуляции (рис. 3а). Линейные размеры тканеинженерных хондро-трансплантатов представлены на рис. 3б.

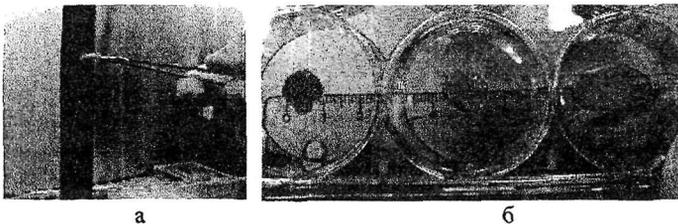


Рис. 3. Внешний вид хондротрансплантатов полученных без применения матриц-носителей

3.2 Биохимический анализ тканеинженерных хрящевых конструкций

3.2.1. Количественное определение кислых гликозаминогликанов

В обезвоженных и обезжиренных пробах (ООП) тканеинженерных конструкций, а также нативного суставного хряща, было проведено количественное определение концентраций кислых гликозаминогликанов (ГАГ). На рис. 4 представлены суммарные результаты анализов всех использованных трёхмерных конструкций, а так же нативного хряща из коленного сустава лошади.

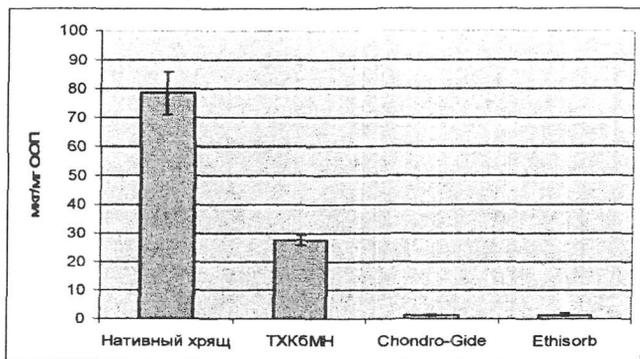


Рис. 4. Содержание протеогликанов в тканеинженерных конструктах и в нативном суставном хряще

Выявленные концентрации сульфатированных гликозаминогликанов в ООП составили для нативного суставного хряща $78,54 \pm 7,46$ мкг на миллиграмм высушенной пробы; для TXKBMH: $27,64 \pm 1,83$ мкг/мг (35% от содержания в нативной ткани); для матрицы Chondro-Gide®: $1,51 \pm 0,34$ мкг/мг (2% от нативной ткани) и для матрицы Ethisorb®: $1,48 \pm 0,42$ мкг/мг (2% от нативной ткани).

Таким образом, значимые различия между хондротрансплантатами лошадей изготовленных по разным методикам свидетельствуют о целесообразности применения механической стимуляции в условиях *in vitro* для повышения синтеза одного из основных компонентов внеклеточного матрикса гиалинового хряща – протеогликанов.

3.2.2 Количественное определение гидроксипролина

Гидролизованнные 6-ти молярной соляной кислотой и высушенные пробы хрящевых конструкций, а также нативной ткани были исследованы на содержание коллагенспецифической аминокислоты – гидроксипролина. Рис. 5 демонстрирует различие в концентрациях в зависимости от вида тканеинженерного конструкта.

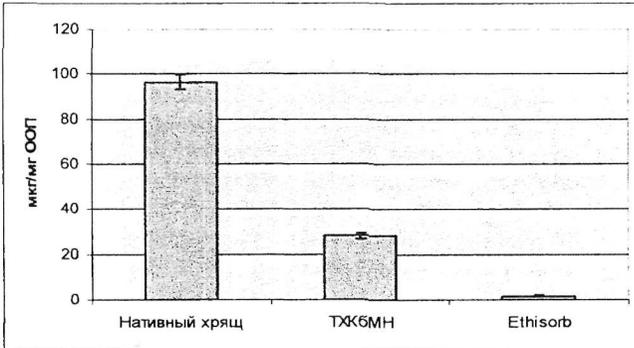


Рис. 5. Концентрация гидроксипролина в трёхмерных тканеинженерных хрящевых конструктах и в нативном суставном хряще

Спектрофотометрически были выявлены следующие количественные показатели гидроксипролина: нативный суставной хрящ: $96,45 \pm 3,30$ мкг/мг ООП, тканеинженерный конструкт без матрицы-носителя: $28,27 \pm 1,40$ мкг/мг ООП (29,3% от содержания в нативной ткани, матрица Ethisorb®: $1,74 \pm 0,22$ мкг/мг ООП (2% от нативной ткани).

В приведённых данных не были учтены результаты анализов проб Chondro-Gide®, так как данный носитель сам состоит из смеси коллагенов, что исключает возможность определения гидроксипролина во вновь синтезированном матриксе.

Достоверно значимые различия ($P < 0,001$) количественного содержания гидроксипролина в тканеинженерных хрящевых конструктах изготовленных по различным методикам, свидетельствуют о позитивном влиянии механического стимулирования на синтез структурного компонента внеклеточного матрикса — коллагена в процессе культивирования хондротрансплантатов *in vitro*.

3.3 Гистологический анализ тканеинженерных хрящевых конструктов

Проведённые гистологические исследования выявили значительную разницу в структурах тканеинженерных конструктов, в распределении компонентов внеклеточного матрикса и в клеточной морфологии.

3.3.1 Гистоморфологическая оценка хондротрансплантатов на матрице Chondro-Gide®

Рис. 6 демонстрирует состояние трёхмерной клеточной культуры на мембране Chondro-Gide® после трёхнедельного культивирования. Данный гистологический срез (окраска толуидиновым синим) иллюстрирует отсутствие чёткой структуры внеклеточного матрикса *de novo* (рис. 6а). Клетки расположены хаотично, отмечаются редкие рыхлые изогнутые группы, в отдельных случаях отмечаются поверхностные

фибробластоподобные образования (рис. 6б). Заселение клетками глубоких слоёв матрицы носит спорадический, одиночный характер (рис. 6в). В тексте диссертации также анализируются гистологические срезы, окрашенные на коллагены и протеогликаны.

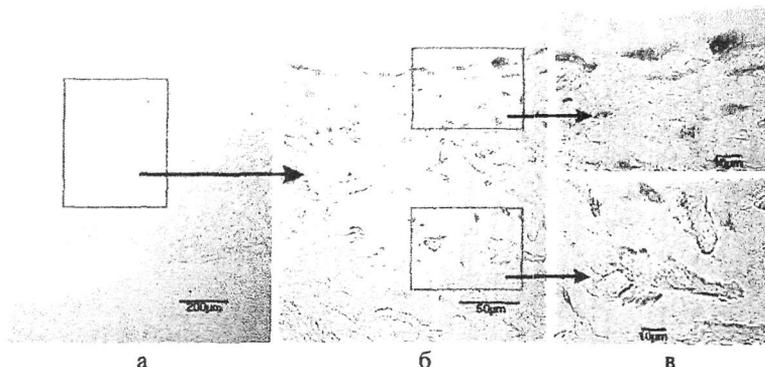


Рис. 6. Гистоморфология хондротрансплантата на матрице Chondro-Gide® (толуидиновый синий, увеличение а - x40, б - x200, в - x400)

3.3.2 Гистоморфологическая оценка хондротрансплантатов на матрице Ethisorb®

На рис. 7 представлены гистологические срезы трёхмерного хрящевого конструкта, полученного на матрице Ethisorb®. Отмечается гомогенное распределение клеточного материала в структуре носителя (рис. 7а), образование рыхлых, но отчётливо различимых структур внеклеточного матрикса (рис. 7б). Трёхмерное состояние клеток в глубоких слоях конструкта характеризуется отсутствием выраженной морфологии (рис. 7в). Поверхность трансплантата покрывает плотный фибробластоподобный клеточный слой. Полученные гистологические результаты согласуются с проведёнными биохимическими анализами и подтверждают наличие в хондротрансплантате, изготовленном *in vitro*, основных компонентов внеклеточного хрящевого матрикса – коллагенов и протеогликанов.

Примечательно иллюстрируемое наличие нерезорбированных структур матрицы-носителя (окрашены более интенсивно), представленных как отдельными нитями так и целыми блоками полимерного материала. Культивирование в трёхмерном состоянии длилось 3-4 недели, что является недостаточным для биорезорбции носителя. Тем не менее, остаётся невыясненным вопрос о полноценном замещении материала матрицы на синтезированный хондроцитами внеклеточный матрикс *de novo*.

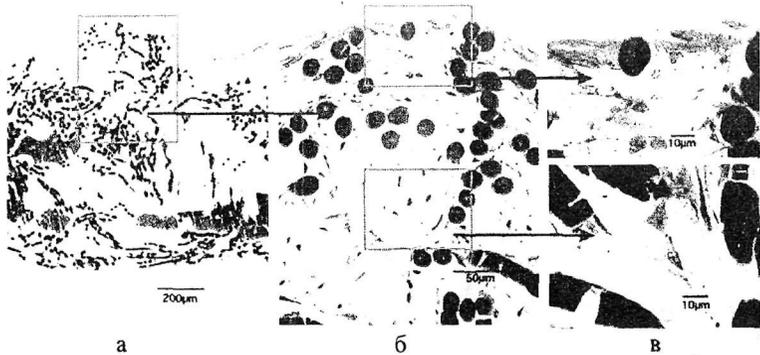


Рис. 7. Гистоморфология хондротрансплантата на матрице Ethisorb® (толуидиновый синий, увеличение а - $\times 40$, б - $\times 200$, в - $\times 400$)

3.3.3 Гистоморфологическая оценка хондротрансплантатов изготовленных без применения матрицы-носителя

Гистологическими исследованиями тканеинженерного хрящевого конструкта без матрицы-носителя (ТХКБМН) обнаружено гомогенное распределение клеток по всему пространству хондротрансплантата. Использование метахроматического красителя толуидиновый синий позволяет выявить гетерогенность распределения внеклеточных структур в ТХКБМН (рис. 8а). Распределение молекул матрикса ещё более чётко демонстрирует применение селективных красителей для коллагенов и кислых ГАГ (иллюстрации представлены в диссертации). Причём характер их распределения схож с таковым в нативном суставном хряще, а именно: поверхностно выявляется преимущественно коллаген, с преобладанием клеток веретенообразной (фиброцитопо-добной) и овальной форм (рис. 8а,б), в глубоких же слоях преобладают протеогликаны и клетки округлой формы (рис. 8в). Отмечается также характерное для глубоких слоёв гиалинового хряща формирование хондронов, в случае ТХКБМН пока ещё представленных одиночными клетками, но необходимо учитывать, что возраст данного конструкта составляет 3-4 недели.

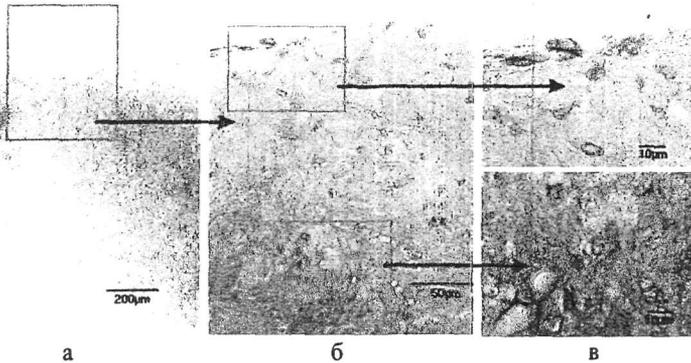


Рис.8. Гистоморфология трёхмерного хондротрансплантата без использования матрицы-носителя (толуидиновый синий, увеличение а - х40, б - х200, в - х400)

Применение механической стимуляции в процессе трёхмерного культивирования хондротрансплантата, по-видимому, активизирует адаптацию клеток тканеинженерного конструкта к нагрузке через синтез молекул внеклеточного матрикса - коллагена и протеогликанов, что позволяет поддерживать клеточный гомеостаз и противостоять компрессионному сдавливанию.

3.4 Иммуногистохимические исследования тканеинженерных хрящевых конструктов

Основными структурными компонентами гиалинового хряща лошади, отвечающими за его амортизационную функцию и осуществляющие безпрепятственное скольжение суставных поверхностей, являются коллаген II типа и кислые ГАГи, представленные у млекопитающих кератансульфатом и хондроитин-6-сульфатом. Для их определения используются методы иммуногистохимического анализа. Однако, на рынке отсутствуют коммерческие препараты антител к коллагенам и протеогликанам лошади. Поэтому в процессе анализа использовались антитела к данным компонентам хрящевого матрикса других животных. Не было получено положительных результатов по выявлению коллагена II типа и протеогликанов на хрящевых трансплантатах на матрицах Chondro-Gide® и Ethisorb®, что служит подтверждением полученных ранее невысоких значений результатов биохимических анализов этих носителей. Позитивное окрашивание на коллаген II типа и кератансульфат (рисунки в материалах диссертации) было получено на тканеинженерных конструктах без использования матриц-носителей. На рис. 9 представлены иммуногистохимически окрашенные срезы ТХКБМН на коллаген II типа.

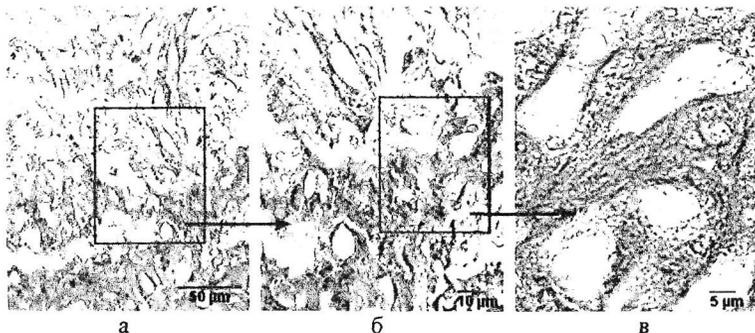


Рис. 9. Иммуногистохимическое окрашивание коллагена II типа в ТХК6МН (увеличение а - х200, б - х400, в - х1000)

Иммуногистохимический анализ выявляет гомогенное распределение молекул полимера в пространстве трансплантата (рис. 9а, б). Более иллюстративно демонстрирует коллагеновую архитектуру тканеинженерного конструкта рис. 9в (тысячекратное увеличение, масляная иммерсия). Расположение окрашенных волокон вокруг клеток свидетельствует о значимости для хрящевого гомеостаза структурных (каркасных) протеинов, каковым и является коллаген II типа.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведённого исследования были выявлены значительные морфологические, биохимические и гистологические различия между изготовленными *in vitro* хондротранс-плантатами лошадей, на основе коммерческих матриц-носителей и трёхмерных хрящевых конструктов без применения матриц-носителей.
2. На основании проведённых биохимических и гистологических анализов была выявлена незначительная поддержка хондрогенеза на матрице Chondro-Gide® у размноженных в монослое и привитых на носитель хондроцитов. В связи с этим, применение данной матрицы для проведения инвазивной репарации повреждений суставного хряща лошади методом тканевой инженерии не является оптимальным.
3. Матрица Ethisorb® демонстрирует свойства необходимые для поддержания трёхмерного клеточного фенотипа: гомогенное распределение клеток по материалу носителя, пролиферация клеток, синтез основных компонентов внеклеточного матрикса. Однако, наличие крупных нерезорбированных полимерных блоков в структуре хондротрансплантата оставляет нерешённой проблему полноценного замещения пространства искусственного материала на вновь синтезированный внеклеточный матрикс гиалинового хряща. Также представляется проблемной структурная организация матрикса *de novo*,

выявляемая гистологически: основная масса плотного внеклеточного матрикса располагается поверхностно, тогда как глубокие слои хондротрансплантата заполнены рыхлой тканью и клетками со слабо выраженным хондроцитарным фенотипом.

4. Тканеинженерные конструкции, созданные без применения матриц-носителей, обнаруживают значительное морфологическое, биохимическое и гистологическое подобие с гиалиновым хрящом:
 - а) клеточная морфология и структурная организация хондротрансплантата схожи с нативной тканью;
 - б) распределение основных компонентов внеклеточного матрикса (коллагенов и протеогликанов) в тканеинженерном конструкте соответствует таковому в суставном хряще;
 - в) концентрация протеогликанов в конструкте составляла до 35%, а содержание коллагенспецифических аминокислот гидроксипролина и гидроксисилина - 29,3% и 18,4% соответственно, от такового в нативной ткани;
 - г) иммуногистохимически установлено, что основным типом коллагена в хондротрансплантате является коллаген II типа, а локализация кератансульфата в околоклеточном пространстве свидетельствует об активности хондроцитов в отношении синтеза протеогликанов.
5. Выявленные в результате исследования морфологические, биохимические и гистологические различия между изготовленными *in vitro* по различным методикам хондротрансплантатами лошади свидетельствуют о перспективности применения при репарации поврежденных суставного гиалинового хряща тканеинженерных конструкций созданных без применения искусственных матриц-носителей.
6. Несмотря на большое число пассажей монослойных культур (3-4), использованная при создании трёхмерных хрящевых конструкций механическая стимуляция значительно влияет на поддержание тканевого хондроцитарного фенотипа и синтетическую активность клеток, что является важной предпосылкой для успешного применения хондротрансплантата при репарации поврежденных суставного хряща лошади.
7. Полная аутологичность тканеинженерного хондротрансплантата изготовленного без применения матриц-носителей к хрящевой ткани пациента позволяет говорить о возможности апробации данного метода и в клинической практике.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

1. Пономарев, И. Диагностика и терапия суставных заболеваний у лошадей: состояние вопроса и прогноз на будущее / И. Пономарев, Д. Барневиц, О. Аст, Е. Каракин, И. Вильке // Проблемы развития коневодства и конного сорта в России. - Новосибирск, 2003. - С. 112-113.
2. Пономарев, И. Мезенхимальные стволовые клетки: новое направление для эффективных терапевтических подходов в ветеринарии / И. Пономарев, И. Вильке, Д. Барневиц, О. Аст, Е. Каракин // Проблемы развития коневодства и конного сорта в России. - Новосибирск, 2003. - С. 114-115.
3. Ponomarev, I. Osteoarthritis-activated chondrocytes produce super pattern of matrix metalloproteinases in osteoarthritis equine cartilage / I. Ponomarev, E. Karakine, D. Barnewitz, I. Wilke // Cartilage & Joint Repair : ECM III Meeting, Davos, Switzerland, 2002. - Davos, 2002. - P. 17.
4. Ponomarev, I. Stammzelltechnologie für Knorpelreparatur beim Pferd – Zellisolierungsmethoden / I. Ponomarev, D. Barnewitz, E. Karakine, I. Wilke // Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt : 11 Heiligenstadter Kolloquium, Tagungsband, 2003. - Tagungsband, 2003. – P. 525-531.
5. Ponomarev, I. Cell Culture Chondrocyte Models for Traumatic and Septic Osteoarthritis in Horse Display Different Matrix Metalloproteinase Patterns / I. Ponomarev, E. Karakine, D. Barnewitz, M. Fischer, A. Donchenko // Chemical and Biological Problems of Proteomics : International Conference, Novosibirsk, Russia, Juli 5-9, 2004. – Novosibirsk, 2004. – P. 54.
6. Ponomarev, I. The Models for Joint Osteoarthritis (OA) in Horse : Matrix Metalloproteinase (MMP) Patterns of Equine Chondrocytes (Cc) in Cell Culture May Mimic the Traumatic (T-OA) and Septic (S-OA) MMP Cartilage Patterns in situ / I. Ponomarev, E. Karakine, D. Barnewitz, Wilke // Strategies in Tissue Engineering : International Conference, Wurzburg, Germany, June 17-19, 2004. – Wurzburg, 2004. – P. 72.
7. Ponomarev, I. Post-operational monitoring of matrix metallo-proteinase patterns in synovial fluids reflects normal or osteoarthritic status of equine joint, after implantation of engineered cartilage / I. Ponomarev, E. Karakine, D. Barnewitz, M. Beck, I. Wilke // Congress on Regenerative Biology, Stuttgart, Germany, November 4-6, 2004. - Stuttgart, 2004. – P. 91.
8. Ponomarev, I. Deutschen Patent. Verfahren zur Herstellung dreidimensionaler tragerfreier Gewebestrukturen und nach diesem Verfahren hergestellte Gewebestrukturen / I. Ponomarev, I. Wilke // Nr. 10 2004 001 225 des Deutschen Patent.-und Markenamtes, 2004.
9. Ponomarev, I. Mechanical stimulation of equine mesenchymal cells as differentiation factor for chondrogenesis / I. Ponomarev, M. Fischer, I. Wilke // Strategies in Tissue Engineering : conference, Wurzburg, Germany, June, 2004. - Wurzburg, 2004. – P. 72.

10. Ponomarev, I. MMP-diagnostics of joint arthritis in horse : is applikation for the primary diagnosis and for post-operational monitoring of joint status / I. Ponomarev, E. Karakine, D. Barnewitz, ChD. Werner, I. Wilke // 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, Munich, Germany, August, 2005. - Munich, 2005. – P. 94.
11. Ponomarev, I. Molecular mechanisms of induction of different forms of horse joint arthritis point out the way for both the differential diagnosis of the diseases and the joint status after implantation of engineered cartilage / I. Ponomarev, E. Karakine, D. Barnewitz, M. Fischer, I. Wilke // 2nd World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, May, 2005. - Leipzig, 2005. – P. 59.
12. Ponomarev, I. Regenerative medicine: New production process for cartilage transplant / I. Ponomarev, M. Fischer, I. Wilke // 2nd World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, May, 2005. - Leipzig, 2005. – P. 94.
13. Ponomarev, I. Scaffold-free cartilage grafts: from an in vitro study to application / I. Ponomarev, E. Kahl, M. Fischer, I. Wilke // 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, Munich., Germany, August, 2005. – Munich, 2005. - P. 268.
14. Пономарев, И. Новые возможности тканевой инженерии при лечении суставных заболеваний лошадей / И. Пономарёв, Д. Барневиц, М. Нойман, И. Вилке // Болезни лошадей: материалы регион. науч.-практ. конф. - Новосибирск, 2006. – С. 60-63.
15. Пономарев, И. Тканевая инженерия при репарации поврежденных суставного хряща у лошадей / И. Пономарев, М. Нойман, И. Вильке, О. Короткевич // Актуальные проблемы животноводства: наука, производство и образование. – Новосибирск: НГАУ, 2006– С. 221-222.
16. Пономарев, И. Хондрогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток у лошадей / И. Пономарев, Е. Каракин, И. Вильке, О. Короткевич // Сиб. Вестн. с.-х. науки. - 2006.- № 4. - С. 38-40.
17. Ponomarev, I. Scaffold-free chondrocyte transplantation as alternative to matrix associated chondrocyte transplantation / I. Ponomarev, D. Paul, M. Neumann, I. Wilke // Cartilage & Joint Repair: ECM VII Meeting, Davos, Switzerland, June, 2006. - Davos, 2006. - P. 73.

18