

Особенности физиологического и репаративного остеогенеза после трансфузии ядросодержащих клеток костного мозга

Р.В. Деев¹, Н.В. Цупкина², В.С. Сергеев¹, В.Б. Сериков³, В.Г. Гололобов¹, Г.П. Пинаев²

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

² Институт цитологии РАН (отдел клеточных культур), Санкт-Петербург

³ Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA 94609, USA

R.V. Deev¹, N.V. Tsupkina², V.S. Sergeev¹, V.B. Serikov³, V.G. Gololobov¹, G.P. Pinaev²

Peculiarities of physiologic and reparative osteogenesis following the transfusion of bone marrow mononuclear cells

¹ Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg; ² RAS Institution of Cytology (Cellular Cultures Department), Saint-Petersburg;

³ Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA 94609, USA

На модели облученных мышей C57Bl/6 изучен процесс физиологической и репаративной регенерации костной ткани после трансфузии GFP-положительных ядросодержащих (моноклеарных) клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6-TgN(ActbGFP)1Osb. Показано, что пересаженные клетки способны дифференцироваться в остеобласты и остециты как при физиологическом, так и при репаративном остеогенезе, причем они имеют приоритетное право на пролиферацию и дифференцировку в организме облученного реципиента. Доля GFP-положительных остеоцитов в компактном веществе диафиза достигала $31 \pm 8\%$.

Ключевые слова: костная ткань, остеогенез, регенерация, зеленый флюоресцирующий белок.

Изучение гистогенеза костной ткани в интересах современного направления клинической медицины — клеточной трансплантации и тканевой инженерии — является актуальной задачей биологии и медицины. От понимания закономерностей физиологического и репаративного остеогистогенеза зависит выбор верных методических подходов к созданию новых клеточных технологий. Эффективность трансплантационного лечения системных заболеваний скелетных тканей оценивается не только в экспериментах [1], но уже и в ходе лечения пациентов с несовершенным остеогенезом [2, 3].

Традиционным источником клеточного материала для пополнения пула камбиальных клеток скелетных тканей является костный мозг, чья стромальная фракция содержит мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) [4, 5]. Их получение и накопление необходимого количества сопряжено с культивированием *in vitro*. Вместе с тем, интактный костный мозг естественным образом содержит эти клетки, но в несопоставимо меньшем количестве. Однако, их введение в организм реципиентов способно влиять на протекание закономерных процессов восстановительного гистогенеза костной ткани [6].

Цель исследования — изучить репаративный и физиологический остеогенез после трансфузии ядросодержащих клеток костного мозга.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на мышах двух линий — трансгенные мыши C57Bl/6-TgN(ActbGFP)1Osb и C57Bl/6. Первые использовались в качестве доноров костного мозга, что связано с необходимостью идентифицировать трансфузированные клетки в организме реципиентов, а все клетки этих мышей вырабатывают зеленый флюоресцирующий белок (green fluorescent protein — GFP). У этих животных получали

Physiologic and reparative regeneration of bone tissue after transfusion of bone marrow GFP-positive mononuclear cells of mice C57Bl/6-TgN(ActbGFP)1Osb was studied in C57Bl/6 mice exposed to radiation. It is shown that transplanted cells are able to differentiate into osteoblasts and osteocytes in both physiologic and reparative osteogenesis, these cells having priority to proliferation and differentiation in the recipient exposed to radiation. The GFP-positive osteocytes number within the substance reached $31 \pm 8\%$.

Key words: bone tissue, osteogenesis, regeneration, green fluorescent protein

костный мозг традиционным путем и выделяли фракцию ядросодержащих (моноклеарных) клеток при центрифугировании (1600 g, 20 мин) в градиенте плотности перколлы (35 и 63 %).

Реципиенты — мыши линии C57Bl/6, перед манипуляциями они были облучены в дозе 7–7,5 Гр. В дальнейшем реципиентов разделили на две серии. Животным первой серии (15 мышей) в хвостовую вену вводили взвесь ядросодержащих клеток мышей-доноров в количестве $1-2 \times 10^6$. Животным второй серии (15 мышей) перед трансфузией осуществляли остеоклазию костей голени, в результате которой формировались многооскольчатые переломы (рис. 1). Выведение животных из эксперимента осуществляли через 15, 30 и 90 суток.

Дальнейшую обработку осуществляли согласно рекомендациям при работе с материалом, содержащим GFP [7]. Гистологические срезы поврежденных конечностей изготавливали на замораживающем микротоме, докрашивали ядра иодидом пропидия и заключали под покровные стекла в пропилгалат. Полученные препараты изучали в лазерном конфокальном сканирующем микроскопе LSM 5 PASCAL на базе AXIOVERT 200M в различных режимах. Для проведения морфометрического анализа подсчитывали долю «зеленых» клеток на 100 остеоцитов не менее чем в 10 полях зрения.

Результаты и обсуждение

Участие GFP-положительных клеток в физиологическом остеогенезе

У животных первой серии после трансфузии наблюдали колонизацию костного мозга донорскими клетками, выявляемыми по их флюоресценции. Кровотворение восстанавливалось. Со стороны костной ткани явных признаков активизации остеогенеза или резорбции обнаружено не было. Донорские клетки находились преимущественно в участках типичной

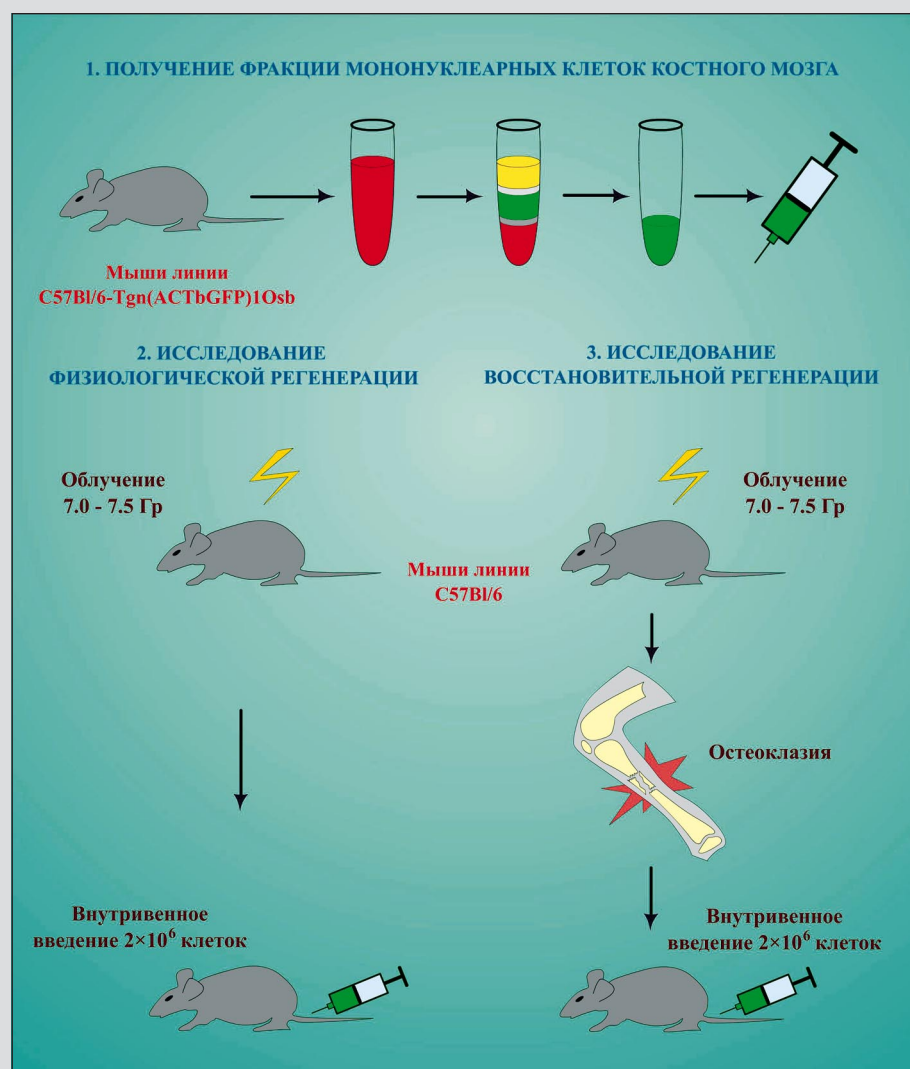


Рис. 1. Схема эксперимента

локализации рассредоточенного камбия скелетных тканей – периосте, эндосте, строме костного мозга, перваскулярном клеточном окружении. Причем, как показали опыты с двухцветной флюоресценцией, большинство из них имеет миелоидное происхождение и не является клетками остеогенной линии [8, 9]. Вместе с тем, обращало на себя внимание наличие большого числа GFP-положительных остеоцитов. Они располагались мозаично по ходу компактного вещества диафизов и особенно хорошо выявлялись при последовательном сканировании препаратов по одному из каналов и последующем компьютерном совмещении (рис. 2, 3). Подсчет доли GFP-положительных остеоцитов через 60 суток после трансфузии показал, что она составляет $31 \pm 8\%$. Полученные нами данные согласуются с установленной эффективностью колонизации костной ткани реципиента при системном введении GFP-положительных клеток костного мозга не способных к адгезии к пластику. Так, по данным M. Dominici и соавт. [2004], при их введении потомками пересаженных клеток являются в среднем 18% остеобластов и остеоцитов, причем в некоторых участках костной ткани их количество достигало 50% [10]. Следует отметить, что как не удивительно, при инфузии пластик-адгезивных дериватов костного мозга доля GFP-положительных костных клеток составила всего 1,5%.

Эти данные позволяют пересмотреть показанную ранее ограниченную способность трансфузированных ядродержащих клеток костного мозга к прогрессивной дифференцировке в остеоцитарном направлении. Так, по данным Wang L. и

соавт. [2005], клетки костного мозга от GFP-положительных мышей обнаруживались исключительно в составе эндоста, выстилающего трабекулы губчатого вещества кости облученной мыши реципиента [8]. Только внутрикостная пересадка детерминированных клеток – остеобластов крышки черепа приводила к включению клеток реципиента в остеогенез у донора.

Обнаружение GFP-положительных остеоцитов требует дальнейшей тщательной проверки для исключения артефактов. Остеоциты проходят длительный путь дифференцировки. Т.е., попав в кровеносное русло и колонизировав костный мозг, стромальные клетки из взвеси донорских мононуклеаров должны дифференцироваться в остеогенные клетки, преостеобласты, остеобласты, которые, синтезировав достаточное количество остеоида, «замуровывают» себя и переходят в терминальную стадию дифференцировки – остеоциты. На это трансфузированным клеткам в нашем опыте потребовалось менее 60 суток. С одной стороны, полученные результаты могут свидетельствовать о высокой скорости ремоделирования пластинчатой костной ткани у мышей. С другой стороны, необходимо помнить о том, что клетки в костной ткани объединены в функциональный синцитий [11]. Его морфологической основой являются межклеточные контакты между остеобластами периоста и эндоста с остеоцитами [12]. Возможно, именно они обуславливают попадание GFP в остеоциты. Однако, если принять эту точку зрения, остается непонятным мозаичный характер расположения GFP-положительных остеоцитов.

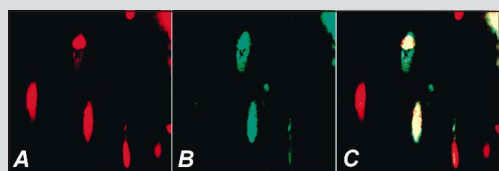


Рис. 2. Остеоциты в компактном веществе костной ткани диафиза большеберцовой кости мыши первой группы (физиологический остеогистогенез):
А – при возбуждении Ar лазером; В – при возбуждении HeNe лазером;
С – комбинированное изображение
Окраска: иодид пропидия. Ув.: $\times 400$

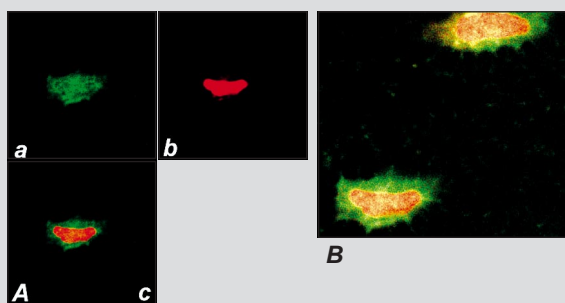


Рис. 3. Донорские (GFP-положительные) остеоциты в компактном веществе костной ткани диафиза большеберцовой кости мыши первой группы (физиологический остеогистогенез):
Aa – при возбуждении Ar лазером; Ab – при возбуждении HeNe лазером;
Ac, B – комбинированное изображение
Окраска: иодид пропидия. Ув.: $\times 700$

Феномен слияния, как объяснение экспрессии остеоцитами GFP, исключается самой архитектурой костной ткани. Вместе с тем, несмотря на полученные первые результаты, опровергающие слияние трансфузированных клеток с клетками реципиентного ложа [10], нельзя исключить слияние остеогенных клеток реципиента с клетками донора на ранних стадиях остеоцитарной дифференцировки, когда остеоциты еще не были «замурованы» в минерализованный матрикс.

Согласно современным общепринятым взглядам, физиологическая регенерация или ремоделирование костной ткани происходит путем деятельности основных (базисных) многоклеточных единиц (БМЕ). В компактном веществе кости они имеют вид цилиндра, характеризующегося

зональностью, в центре которого проходит кровеносный сосуд [13, 14]. Для каждой зоны описано наличие клеток определенного фенотипа, которые и определяют характер физиологических процессов в определенном участке БМЕ.

БМЕ были обнаружены нами в компактном веществе, формирующем диафиз большеберцовой кости (рис. 4). В зоне а (конус резорбции), являющейся вершиной цилиндра, обнаруживалось сосредоточение резорбирующих кость клеток – остеокластов. При большом увеличении (рис. 5А) определялись эрозивные лакуны, а далее вглубь БМЕ – щеточная каемка и тела многоядерных клеток, которые по морфологическим и топографическим характеристикам можно определить как остеокласты. Следует отметить, что эти клетки также экспрессируют ген зеленого белка.

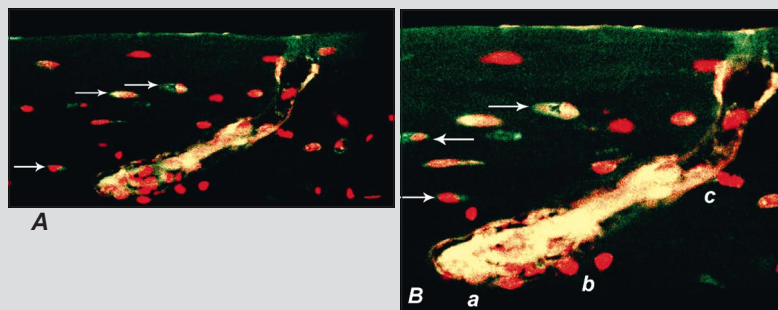


Рис. 4. Базисная многоклеточная единица, ремоделирующая костную ткань диафиза большеберцовой кости, животное первой группы:
а – конус резорбции; б – зона реверсии;
с – замыкающий конус.
Стрелками указаны GFP-положительные остеоциты
Окраска: иодид пропидия. Ув.: А $\times 350$; В $\times 600$

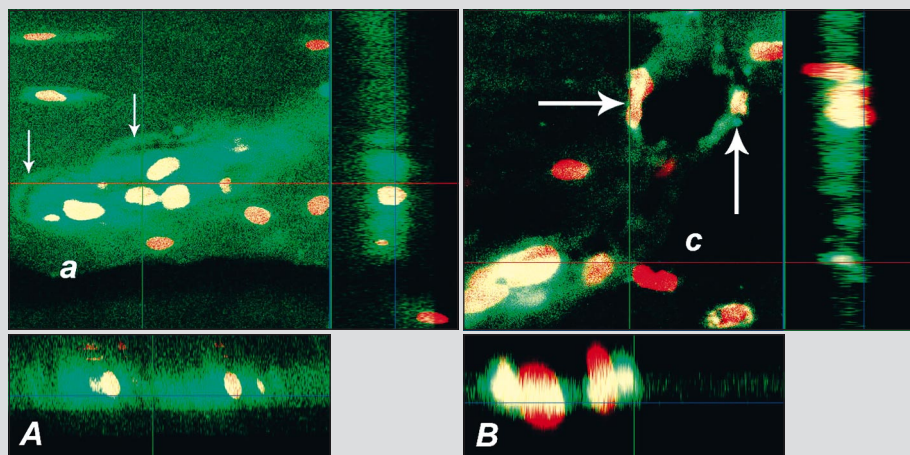


Рис. 5. Базисная многоклеточная единица, ремоделирующая костную ткань диафиза большеберцовой кости, животное первой группы:
А (а) – конус резорбции с остеокластами, стрелками указано дно эрозивных лакун, в верхней левой части снимка – GFP-положительные остеоциты;
В (с) – замыкательный конус, выстланный эндотелиоцитами (указаны стрелками)
Окраска: иодид пропидия. Ув.: $\times 800$

В следующей зоне БМЕ (b) – зоне реверсии – содержатся клетки различного происхождения и функции – макрофаги, эндотелиоциты, остеобласты и др. В изученном нами материале данный участок был заполнен клетками различной морфологии, часть из них синтезировали зеленый белок. Сделать обоснованные предположения относительно их гистогенетической принадлежности было невозможно.

Третья зона БМЕ (c) – «закрывающий конус» – содержит в основном эндотелиоциты вросшего сосуда и остеобласты, формирующие новый костный матрикс. На препаратах в данном участке определялись в основном уплотненные GFP-положительные клетки, выстилающие устье БМЕ (см. рис. 4B). По морфо-топографическим признакам их можно охарактеризовать как эндотелиоциты.

Таким образом, при изучении эффектора ремоделирования компактной кости – БМЕ установлено, что основные клеточные элементы – остеокласты, эндотелиоциты, остеобласты имели донорское происхождение. Очевидно, их клетки-предшественники находились среди инфузировавшихся ядросодержащих компонентов костного мозга. Следует отметить, что для точной идентификации клеточных типов участвующих в ремоделировании кости, необходима иммуногистохимическая идентификация по маркерным признакам: тартрат-резистентной кислой фосфатазы и рецепторов к кальцитонину у остеокластов [15], фактора свертывания фон Виллибранда у эндотелиоцитов [16], основных белков остеобластов – остеокальцину, остеопонтину, щелочной фосфатазе [15].

Участие GFP-положительных клеток в репаративном остеогенезе

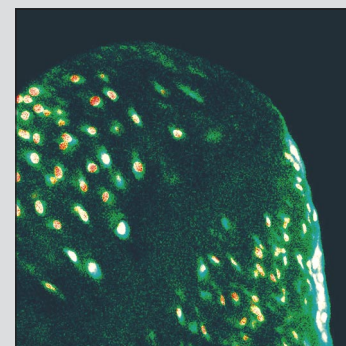
При изучении репаративных процессов в кости после перелома установлено наличие GFP-положительных клеток как в элементах ее рассредоточенного камбия – периосте, эндосте, строме костного мозга, периваскулярном окружении, так и непосредственно в костной ткани.

Клетки надкостницы и эндоста, в особенности вблизи перелома, активно синтезировали зеленый белок. Они имели различную геометрическую форму, от вытянутых – веретеновидных до кубических, с эксцентрично расположенным ядром, лежащими непосредственно на поверхности костных трабекул или внутренней поверхности диафиза. Следовательно, по своим морфо-топографическим особенностям они могли быть идентифицированы как преостеобласты, остеобласты, выстилающие кость клетки. Их непосредственное участие в процессе репаративного остеогенеза не вызывало сомнений, причем регенерат был в меньшей степени мозаичен, чем интактная кость. Практически все клетки регенерата были GFP-положительные. Регенерат имел типичное для многооскольчатых переломов строение. Костные осколки вовлекались в единую «костную мозоль», будучи источником развития ретикулофиброзной костной ткани реципиентного происхождения. Имелись участки, образованные гиалиновой хрящевой тканью. Трабекулы регенерата могли иметь остеохондрогенное строение (рис. 6). «Зеленые клетки» вовлекались в процесс энхондрального остеогенеза – провизорный хрящевой регенерат развивался из трансфузированных костномозговых клеток-предшественников.

Таким образом, трансфузированные в составе ядросодержащей фракции костного мозга клетки-предшественники для механоцитов не только колонизируют и существенно

пополняют элементы рассредоточенного камбия костной ткани реципиента, но и прогрессивно дифференцируются в клетки-продуценты хрящевого или костного матрикса. При этом, именно клетки донора обладают приоритетным правом на пролиферацию и дифференцировку, что может быть связано с повреждением клеток реципиента в ходе облучения. Данная закономерность справедлива как для физиологической регенерации, так и для репаративной. Это положение, однако, не исключает пролиферацию и дифференцировку пересаженных клеток, несущих GFP в организме интактного реципиента.

*Рис. 6. Костно-хрящевая трабекула в составе регенерата у животных второй группы, построенная из GFP-положительных клеток
Окраска: иодид пропидия
Ув.: × 350*



Дифференцировочный потенциал GFP-положительных ММСК был изучен на модели периодонтального костного дефекта у собак. После этапа культивирования ММСК были трансплантированы в периодонтальные дефекты. Установлено, что в ходе регенерации в течение 1 мес они активно участвовали в восстановлении тканей и дифференцировались во все локальные виды механоцитов – фибробласты, остеобласты, остеоциты и даже цементобласты [17].

Недавно получены данные, что трансфецированные лентивирусом (GFP) человеческие ММСК, входящие во фракцию ядросодержащих клеток костного мозга, способны участвовать в гетеротопическом остеогенезе (подкожно) у иммунокомпромиссных мышей, с дифференцировкой в остеобласты и остеоциты [18]. Клетки вырабатывали зеленый белок в ходе всего эксперимента – 2 мес.

Полученные нами данные свидетельствуют об участии трансфузированных клеток в продуктивном развитии костной ткани как в норме, так и при переломах. За счет полипотентности костномозговых клеток-предшественников в зависимости от условий микроокружения эти клетки способны дифференцироваться в хондро- или остеогенном направлении. После трансфузии костная ткань облученных животных становится, по сути, химерной. Требуется дальнейшего уточнения вопрос о том, характерна ли эта закономерность для всех реципиентов или только для иммунокомпромиссных животных, животных с компрометированным собственным клеточным резервом – рассредоточенным камбием костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Philip Morris USA Inc. and Philip Morris International (V. Serikov).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wang X., Li F., Niyibizi C. Progenitors systemically transplanted into neonatal mice localize to areas of active bone formation in vivo: implications of cell therapy for skeletal diseases. *Stem Cells* 2006; 24(8): 1869–78.
2. Horwitz E.M., Prockop D.J., Gordon P.L. et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001; 97(5): 1227–31.
3. Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K. et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99(13): 8932–7.
4. Owen M.E., Friedenstein A.J. Stromal stem cells : marrow-derived osteogenic precursors. *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues. Proceedings of a symposium held at the Ciba Foundation. London. Oct. 13–15, 1987.* London: John Wiley & Sons. 1988: 42–53.
5. Horwitz E., Le Blanc K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5): 393–5.
6. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Сериков В.Б., Гололобов В.Г., Пинаев Г.П. Участие трансфузированных клеток костного мозга в репаративном остеогенезе. *Цитология* 2005; 46(9): 755–9.
7. Jiang X., Kalajic Z., Maye P. et al. Histological Analysis of GFP Expression in Murine Bone. *J. Histochem. Cytochem.* 2005; 53(5): 593–602.
8. Bilic-Curcic I., Kronenberg M., Bellizzi J. et al. Visualizing levels of osteoblast differentiation by a two color promoter–GFP strategy: type I collagen–GFPcyan and osteocalcin GFPtpz. *Genesis* 2005; 43: 87–98.
9. Wang L., Liu Y., Kalajic Z. et al. Heterogeneity of engrafted bone-lining cells after systemic and local transplantation. *Blood* 2005; 106(10): 3650–7.
10. Dominici M., Pritchard C., Garlits J.E. et al. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(32): 11761–6.
11. Гололобов В.Г., Деев Р.В. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферен. *Морфология* 2003; 123(1): 9–19.
12. Schirrmacher K., Smitz I., Winterhager E. et al. Characterization of gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calif. Tiss. Int.* 1992; 51: 285–90.
13. Frost H.M. Treatment of osteoporoses by manipulation of coherent bone cell populations. *Clin. Orthop.* 1979; 143: 227–44.
14. Dempster D.W. Ремоделирование кости. Остеопороз. М., СПб.: Бином, Невский диалект, 2000: 85–108.
15. Гололобов В.Г., Дулаев А.К., Деев Р.В., Цыган Е.Н. Морфофункциональная организация, реактивность и регенерация костной ткани / Под ред. проф. Р.К. Данилова, проф. В.М. Шаповалова. СПб.: ВМедА, 2006: 47.
16. Ponder K.P. Gene therapy for hemophilia. *Curr. Opin. Hematol.* 2006; 13(5): 301–7.
17. Hasegawa N., Kawaguchi H., Hirachi A. et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J. Periodontol.* 2006; 77(6): 1003–7.
18. Piersanti S., Sacchetti B., Funari A. et al. Lentiviral transduction of human postnatal skeletal (stromal, mesenchymal) stem cells: in vivo transplantation and gene silencing. *Calcif. Tissue Int.* 2006; 78(6): 372–84.