

8. Деев Р. В., Гололобов В. Г. Остеогенные свойства культуры стромальных клеток костного мозга. Материалы докл. IX Конгресса междунар. ассоциации морфологов. Бухара, 14–17 мая 2008 г. // Морфология. 2008. Т. 133. Вып. 2. С. 39.
9. Деев Р. В., Гололобов В. Г., Цупкина Н. В. и др. Гистогенетический принцип создания тканеинженерных конструкций скелетных тканей. Вопросы морфологии XXI века. Вып. 1: Сб. научн. тр., посвященный 100-летию каф. мед. биологии СПбГМА им. И. И. Мечникова. СПб.: СПбГМА им. И. И. Мечникова; ДЕАН. 2008. С. 114–119.
10. Деев Р. В., Цупкина Н. В., Бозо И. Я. и др. Культура скелетогенных клеток как основа клеточных технологий в травматологии и ортопедии. Всерос. симпозиум «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий». СПб., 12–14 октября 2009 г. // Цитология. 2009. Т. 52. № 9. С. 760–761.
11. Деев Р. В., Цупкина Н. В., Гололобов В. Г. и др. Влияние трансплантированной культуры стромальных клеток костного мозга на репаративный остеогенез в области дефекта теменных костей // Цитология. 2008. Т. 50. № 4. С. 293–301.
12. Клишов А. А. Гистогенез и регенерация тканей. Л.: Медицина, 1984.
13. Лазаренко Ф. М. Закономерности роста и превращения тканей и органов в условиях культивирования их в организме. М.: Медгиз, 1959.
14. Хлопин Н. Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. Л.: Изд-во АН СССР, 1946.
15. Шевченко Н. А. Гетероморфия как принцип тканевой организации // Тез. докл. 9-й Междунар. конгресса анатомов. М., 1970. С. 162.

Горбач Е. Н.

ГИСТОСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМЫ КОЖНОГО ПОКРОВА ГОЛЕНИ СОБАКИ ПРИ ЕЕ УДЛИНЕНИИ МЕТОДОМ ЧРЕСКСТОТНОГО ДИСТРАКЦИОННОГО ОСТЕОСИНТЕЗА

*ФГУ Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»
им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий, Курган, e-mail: gorbach.e@mail.ru*

Открытие общебиологического свойства тканей «отвечать на возникающие в них напряжения, преимущественно напряжения растяжения, регенерацией и ростом» (эффект Илизарова) позволило поставить и решить задачи управления процессами роста и формообразования в живых организмах. На основании этого феномена разработано огромное количество способов лечения патологий ортопедического и травматологического профиля. Известно, что при удлинении конечности методом чрескостного дистракционного остеосинтеза (ЧДО) состояние параоссальных тканей играет важную роль. В связи с этим в последние годы в РНЦ «ВТО» особое внимание уделяется состоянию мягкотканого компонента, в том числе и кожи. Исследования акустических свойств кожного покрова пациентов с патологией различных сегментов конечностей в разные периоды лечения методом ЧДО выявили повышение коэффициента анизотропии, связанное

с возрастанием скорости звука в коже, в направлении, совпадающем с вектором ее растяжения [1]. Согласно результатам гистологических исследований дозированно растянутого кожного покрова существует связь этих изменений со структурной перестройкой фибриллярного остова дермы [2, 3]. При реконструктивных операциях на кисти в условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза прослежена общая тенденция к активному росту и утолщению пролиферирующих слоев эпидермиса и восстановлению нормального строения дермы [4].

Однако комплексного исследования состояния кожного покрова в условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза с позиций современной гистологии, включая клеточно-дифференную организацию тканей [5], не проводилось.

Цель исследования – изучить особенности гистоструктуры дермы кожного покрова голени собаки на каждом из этапов ЧДО.

Материал и методы исследования. Материалом исследования послужила кожа передней поверхности голени 14 взрослых беспородных собак, которым через 5 суток после флексионной остеоклазии берцовых костей осуществляли удлинение голени (операции выполнены д. м. н. С. А. Ерофеевым, к. в. н. А. А. Емановым) путем осуществления ручных подкруток гаек по стержням (суточный темп удлинения – 1 мм за 4 приема). Величина удлинения голени составляла $17,6 \pm 0,4$ %. Животных выводили из опыта через 28 суток дистракции, 30 суток фиксации, 30 суток после снятия аппарата. Уход, оперативные вмешательства, эвтаназию животных осуществляли в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения РФ к работе экспериментально-биологических клиник, а также Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. В качестве контроля исследовали кожный покров 6 интактных собак. Часть материала фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезжовивали и заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, орсеином по Унны – Тенцеру, импрегнировали по Рассказовой. Другую часть фрагментов кожи фиксировали в смеси альдегидных фиксаторов, дегидратировали и заливали в аралдит. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим с постановкой ШИК-реакции. Оцифровку изображений выполняли на аппаратно-программном комплексе «Диа-Морф» (Россия). Морфометрию толщины дермы, ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО), площадь клеток фибробластического дифферона осуществляли при помощи программы-анализатора изображений «ВидеоТесТ-Морфология 4.0» (Россия). Численную плотность клеток дермы рассчитывали на 1 мм^2 , предварительно подсчитывая количество клеток в поле зрения микроскопа при общем увеличении 640×. Статистическую обработку данных выполняли с использованием компьютерной программы AtteStat (Гайдышев И. П., 2003).

Результаты исследования и их обсуждение. Через 28 суток дистракции в дерме различались сосочковый и сетчатый слои. В сосочковом слое наблюдалась активная макрофагальная реакция, менее выраженная в сетчатом слое кожи. Вблизи микрососудов отмечали скопления тучных клеток. В сосочковом и наружной части сетчатого слоев дермы наблюдали значительное количество микрососудов, преимущественно капиллярного типа. Коллагеновые волокна имели более плотную, чем в контроле упаковку и были направлены вдоль вектора растяжения.

Наряду с объемными пучками волокон определялись более тонкие сетчатые структуры и микрофибрилярный компонент, обнаруживающийся в перичеслюлярном пространстве фибробластов. В сетчатом слое дермы эластические волокна имели плоскую и цилиндрическую форму и были более короткие и утолщенные, по сравнению с таковыми в контроле. В сосочковом слое наблюдали тонкие разветвленные эластические волокна, формирующие нежные сетчатые структуры. Волосные фолликулы имели гнездовое расположение. Преобладали их молодые формы. При этом встречались и одиночно расположенные фолликулы с признаками деструкции. Наблюдали зачатки дериватов кожи. Толщина дермы на уровне сосочков и в межсосочковом пространстве, по сравнению с контролем, уменьшалась на 5 и 6,8 % соответственно (табл. 1).

Таблица 1

**ДИНАМИКА ТОЛЩИНЫ ДЕРМЫ КОЖИ
НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ УДЛИНЕНИЯ ГОЛЕНИ**

Этапы эксперимента	Толщина дермы (M±m)			
	на уровне сосочков		в межсосоч. пространстве	
	%	мм	%	мм
Дистракция 28с.	95±0,96*	3,9±0,095*	93,2±0,97*	3,23±0,11*
Фиксация 30с.	99,3±0,7***	4,08±0,08***	108,6±1,7*	3,77±0,09*
Без аппарата 30с.	98,9±1,12***	4,06±0,12***	99,8±1,27***	3,46±0,07***
Контроль	100	4,11±0,054	100	3,47±0,04

* при $p < 0,01$, ** при $p < 0,05$, *** при $p > 0,05$.

К окончанию периода дистракции в дерме отмечалось достоверное повышение значений численной плотности всех типов встречаемых в дерме клеток, за исключением фиброцитов. Численная плотность фибробластов ($N_{Аfb}$) превышала показатели контроля в 9,4 раза, периваскулярных клеток ($N_{Аpvk}$) – в 3 раза, клеток макрофагального ряда ($N_{Аmт/mfg}$) – в 5,1 раза, тучных клеток ($N_{Аtk}$) – в 32,2 раза (рис. 1). Максимальные значения численной плотности при этом были характерны для фибробластов. Популяция фиброцитов при этом, согласно значениям $N_{Аfz}$, становилась меньше, чем в дерме интактных животных в 1,6 раза (табл. 2).

Таблица 2

**ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОЙ ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК
В 1 ММ² ДЕРМЫ ГОЛЕНИ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ЧДО**

Периоды эксперимента	$N_{Аi}$ (M±m)				
	фиброциты	фибробласты	периваскулоциты	моноциты/ макрофаги	тучные клетки
Дистракция 28 с	20,46±0,9**	91,97±3,9*	40,4±1,14*	32,96±1,53*	9,03±0,18*
Фиксация 30 с	6,77±0,25*	69,41±2,8*	23,85±1*	82,79±3,21*	13,23±0,27*
Без аппар. 30 с	26,6±1,2***	49,41±1,9*	25,14±1,1*	28,07±0,93**	10,23±0,15*
Контроль	32,58±1,4	9,81±0,41	13,36±0,8	6,40±0,21	0,278±0,01

* при $p < 0,01$, ** при $p < 0,05$, *** при $p > 0,05$.

Анализ площади профилей клеток фибробластического дифферона интактных животных показал неоднородность его клеточного состава по этому критерию. В зависимости от значений площади клетки были объединены в 5 основных групп (рис. 1). В результате аналогичного количественного анализа дермы опытных животных выявлено, что через 28 суток distraction в дерме преобладали мелкие клетки с площадью менее 30 мкм^2 , количество которых составляло 42 % от всех клеток фибробластического дифферона, в 4,2 раза превышая значения интактных животных. Одновременно отмечали значительное уменьшение доли клеток с площадью $31\text{--}60 \text{ мкм}^2$ и $61\text{--}90 \text{ мкм}^2$ – в 1,8 и 7,8 раза соответственно. Содержание клеток с площадью $91\text{--}120 \text{ мкм}^2$ было аналогичным норме и составляло 6 %, при этом доля клеток более 120 мкм^2 (20 %) превышала таковую в контроле в 20 раз.

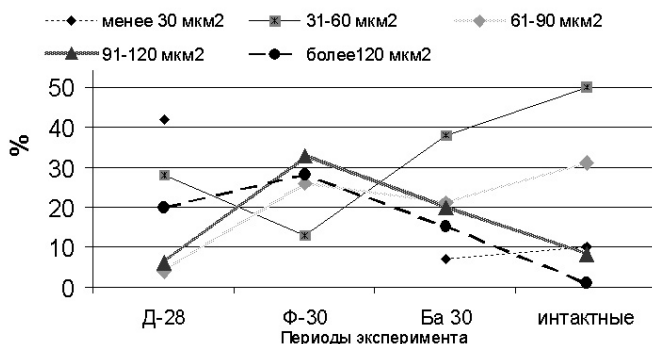


Рис. 1. Соотношение клеток различной площади в фибробластическом диффероне дермы в разные периоды ЧДО

Анализ ЯЦО показал, что в периоде distraction для фибробластического дифферона характерно уменьшение (по сравнению с интактной нормой) доли клеток с преобладанием цитоплазматического компонента и одновременное увеличение процентного содержания клеток с преимущественно ядерной составляющей (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что на данном этапе ЧДО значительную долю дифферона составляют малодифференцированные фибробласты [6, 7].

Через 30 суток фиксации конечности в аппарате дерма содержала умеренное количество клеточных элементов, представленных фибробластами, фиброцитами, макрофагами и тучными клетками, обнаруживающимися преимущественно в сосочковом слое. В сетчатом слое наблюдали зачатки волосяных фолликулов и сальных желез. В глубоких слоях дермы преобладали вены и артериолы. В сосочковом и наружной части сетчатого слоев выявляли сосуды капиллярного типа, плотность которых превышала таковую в норме. В сосочковом слое и в соединительнотканых капсулах волосяных фолликулов определялись свободные нервные окончания с утолщениями в виде колб роста, в сетчатом слое – нервные стволы с признаками неогенеза нервных волокон. Коллагеновые и эластические волокна располагались более хаотично, чем в период distraction, архитектура сетча-

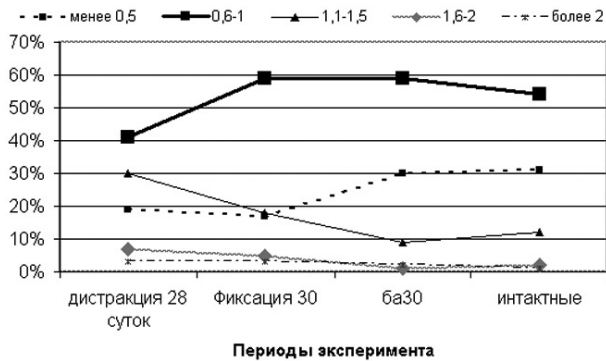


Рис. 2. Динамика ЯЦО клеток фибробластического дифферона в дерме на каждом из этапов ЧДО

того слоя была приближена к норме, отличаясь присутствием новообразованных коллагеновых и эластических структур. Количество эластических волокон в дерме увеличивалось. Их более тонкие конечные ветви проникали в сосочковый слой, достигая вершины кожных валиков. Толщина дермы на уровне сосочков не имела достоверных отличий от нормы, в межсосочковом пространстве — превышала их на 8,6 % (табл. 1), что связано с активизацией процесса фибриллогенеза.

При изучении клеточного состава выявлено, что к окончанию периода фиксации самой многочисленной являлась популяция макрофагов, численная плотность которой превышала контрольные значения в 12,9 раза и в 2,5 раза — значения предыдущего периода эксперимента. Аналогичные показатели фибробластов и периваскулярных клеток были незначительно (в 1,32 и 1,7 раза) ниже, чем в период дистракции и выше интактной нормы в 7 и 1,8 раз соответственно. Продолжали повышаться и значения численной плотности тучных клеток: в сравнении с периодом дистракции — в 1,47 раза, с показателями интактных животных — в 47,6 раза. Наименьшие показатели численной плотности клеток были характерны для фиброцитов. Они в 4,8 раза были ниже контрольных значений и в 3 раза — значений предыдущего экспериментального периода (табл. 2).

Через 30 суток фиксации в дерме отмечали уменьшение количества клеток площадью 31–60 мкм², по сравнению с периодом дистракции в 2,1 раза и в 3,9 раза — по сравнению с контролем. В этот период увеличивалась до значений нормы доля клеток с площадью 61–90 мкм² (26 %). Соответственно в 5,5 и в 1,4 раза по отношению к данным периода дистракции и в 4,1 и в 28 раз по отношению к норме возрастал процент клеток с площадями 91–120 и более 120 мкм². Пул фибробластических клеток площадью менее 30 мкм² в дерме отсутствовал (рис. 1).

Через 30 суток фиксации доли клеток с ЯЦО менее 0,5; 1,6–2 и более 2 значимо не изменились (рис. 2). По сравнению с предыдущим этапом эксперимента в 1,4 раза увеличивалось процентное содержание клеток, ЯЦО которых составляло 0,6–1, достигая показателей контроля. Доля клеток с ЯЦО 1,1–1,5 снизилась с 30 % в период дистракции до 18 %, продолжая превышать показатели нормы в 1,5 раза, что свидетельствует о незначительном уменьшении пула малодифференцированных фибробластов и появлении фибробластов большой площади

с преобладающей долей цитоплазмы, следовательно — с большей биосинтетической активностью.

Через 30 суток после снятия аппарата фиброархитектоника сосочкового и сетчатого слоев дермы по строению была приближена к норме. Лишь отдельные коллагеновые и эластические волокна в глубоких слоях сетчатого слоя сохраняли продольную направленность. В дерме сохранялась увеличенная клеточная плотность, присутствовали зачатки дериватов кожи. Толщина дермы во всех участках была аналогична контролю (табл. 1). В этот период эксперимента ведущими являлись клетки фибробластического дифферона. N_{Ab} в 5 раз превышала контрольные показатели. По сравнению с периодом фиксации, численная плотность фибробластов была уменьшена в 1,4 раза. Также отмечалось и резкое снижение (в 3 раза) показателей $N_{Amnt/mfg}$, при этом, по сравнению с контролем, показатель численной плотности макрофагов оставался повышенным в 4,4 раза. Значения N_{Apvk} и N_{Atk} , по сравнению с периодом фиксации, достоверно не отличались, но были выше показателей контрольной серии в 1,9 и 36,5 раз соответственно. N_{Aiz} в этот период значительно (в 3,9 раза) увеличивалась, приближаясь к показателям интактной нормы (табл. 2). Через месяц после снятия аппарата клетки площадью менее 30 μm^2 составляли 7%, что приближалось к показателям контрольной серии. Доля клеток, площадь которых составляла 31–60 μm^2 , по сравнению с периодом фиксации, возрастала почти в 3 раза, оставаясь в 1,32 раза меньше таковой у интактных животных. Процент клеток площадью 61–90 μm^2 был аналогичен значению предыдущего периода эксперимента и в 1,48 раза был понижен относительно контроля. Показатели ЯЦО клеточных групп приближались к значениям интактных животных, за исключением пулов клеток с ЯЦО 1,6–2 и более 2, где значения в первом случае были вдвое ниже, а во втором — вдвое выше контрольных.

Проведенные исследования показали, что в период distraction выявляются одновременно признаки растяжения и гистогенеза дермы кожного покрова. В пользу первого утверждения свидетельствуют уменьшение толщины дермы, параллельная направлению воздействия растягивающих усилий ориентация коллагеновых и эластических волокон, в пользу второго — формирование молодых и зачаточных форм волосяных фолликулов, активные процессы коллагено- и эластогенеза. Кроме того, для периода distraction характерно присутствие активированных камбиальных источников регенерации, пролиферация клеток и начало их дифференцировки, т. е. показатели, характерные для регенерационного (distractionного) гистогенеза. При этом отмечается выраженная гетероморфия как ведущего фибробластического дифферона, так и проявление междифферонной гетероморфии (изменения соотношения тучных клеток, макрофагов, периваскулоцитов). К концу периода фиксации и после снятия аппарата показатели толщины дермы приближаются к норме. Ведущим клеточным диффероном, обеспечивающим процесс ремоделиции волокнистого остова кожи к окончанию периода distraction, является моноцитарно-макрофагальный, через месяц после снятия аппарата — вновь фибробластический. В эти периоды продолжается дифференцировка клеток ведущего дифферона, о чем свидетельствует появление фибробластов с признаками выраженной биосинтетической активности, уменьшение клеточной плотности и преобладание в ткани межклеточного вещества.

Постепенное снижение внутридифферонной гетероморфии фибробластов, присутствие значительного количества макрофагов и тучных клеток свидетельствует о фазе адаптивной перестройки. Через 30 дней после снятия аппарата процесс адаптивной перестройки дермы приближен к завершению.

Выявленные особенности дермы на каждом из этапов ЧДО, анализ реактивных изменений различных клеточных дифферонов могут служить критериями для оценки фазности репаративных процессов, развивающихся в создаваемых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевцов В. И., Гребенюк Л. А. Характеристика реологических и акустических свойств кожного покрова нижней конечности человека при ее удлинении // Физиология человека. 1998. Т. 20. № 1. С. 64–69.
2. Горбач Е. Н. Морфологическая характеристика кожного покрова голени в различных условиях чрескостного distractionного остеосинтеза // Морфология. 2008. № 3. С. 35.
3. Чикорина Н. К., Горбач Е. Н., Баранова С. В. Гистоструктура кожи межпальцевых промежутков кисти, используемая для фалангизации сросшихся пальцев у больных синдактилией // Морфологические ведомости. 2004. № 1–2. С. 117.
4. Горбач Е. Н., Шабалин Д. А. Морфологические изменения кожи межпальцевых промежутков кистей с врожденным отсутствием и посттравматическими культями пальцев в процессе лечения методом чрескостного distractionного остеосинтеза // Гений ортопедии. 2009. № 2. С. 11–16.
5. Данилов Р. К. Учение о гистогенезе и регенерации тканей: современное состояние и перспективы развития // Морфологические основы гистогенеза и регенерации тканей. СПб.: ВМедА, 2001. С. 284–327.
6. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань: функциональная морфология и общая патология. М., 1981.
7. Чернух А. М., Фролов Е. П. Кожа. М.: Медицина, 1982.

Григорян Б. А.

РЕГЕНЕРАЦИОННЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

*Кафедра гистологии (заведующий – проф. Р. К. Данилов)
Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург*

Исследования по изучению регенерационного гистогенеза показывают, что ведущая роль в восстановительном процессе принадлежит закономерностям нормального гистогенеза [1, 2]. Дифференцировка адипоцитов в эмбриональном и постнатальном периодах описана в ряде работ [3, 4]. Однако процессы репаративной регенерации жировой ткани изучены слабо.

Цель исследования – дать анализ состояния жировой ткани гиподермы кожи и процесса адипогенеза после травмы.