

17. *Stewart H. J., Morgan L., Jessen K. R., Mirsky R.* Changes in DNA synthesis rate in the Schwann cell lineage in vivo are correlated with the precursor Schwann cell transition and myelination // *Eur. J. Neurosci.* 1993. Vol. 5(9). P. 1136–1144.
18. *Wakao S., Matsuse D., Dezawa M.* Mesenchymal stem cells as a source of Schwann cells: their anticipated use in peripheral nerve regeneration // *Cells Tissues Organs.* 2014. Vol. 200(1). P. 31–41.

*Плакса И. Л.<sup>1,2</sup>, Мавликеев М. О.<sup>3</sup>, Бозо И. Я.<sup>1,4</sup>,  
Абызова М. С.<sup>3</sup>, Деев Р. В.<sup>1,5</sup>*

## РЕГЕНЕРАЦИОННЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ ПАРАОССАЛЬНЫХ ГЕМАТОМАХ У ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>ПАО «Институт стволовых клеток человека» (директор – А. А. Исаев), Москва;

<sup>2</sup>Отделение патологической анатомии (заведующий – Н. А. Савёлов) Московской городской онкологической больницы № 62 ДЗМ, Москва;

<sup>3</sup>Кафедра морфологии и общей патологии (заведующий – проф. А. П. Киясов) Казанского(Приволжского) федерального университета, Казань;

<sup>4</sup>Кафедра хирургической стоматологии (заведующий – проф. А. Ю. Дробышев) Московского государственного медико-стоматологического университета им. А. И. Евдокимова, Москва;

<sup>5</sup>Кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины (заведующий – Р. В. Деев) Рязанского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова, Рязань, e-mail: i.plaksa2014@yandex.ru

---

Несмотря на широкое внедрение в клиническую практику современных методов хирургического лечения переломов и костных дефектов, нарушение консолидации различной степени выраженности развивается у 5–48 % пациентов в зависимости от локализации повреждения и его особенностей [8, 14], что обуславливает необходимость проведения фундаментальных исследований регенерации костной ткани, которые должны быть направлены на определение «мишеней» для терапевтической коррекции нарушения консолидации. Теоретические основы учения о регенерационном гистогенезе позволяют полнее раскрыть сложные процессы, которые происходят в посттравматических регенератах со сложной клеточно-дифферонной и пространственно-временной организацией тканей [1, 2, 4, 5].

В связи с этим целью настоящей работы является исследование межклеточных молекулярных механизмов репаративной регенерации костной ткани при ее травматическом повреждении с позиции современной концепции о регенерационном гистогенезе.

**Объект исследования** – параоссальные гематомы, являющиеся удобным материалом для изучения ранних этапов естественного остеогистогенеза в периостальной части костного регенерата. Гематомы были получены от пациентов в ходе хирургического лечения в течение первых 12 суток после перелома (n = 12;

регистрационный номер в международном регистре клинических исследований ClinicalTrials.gov: NCT03244969). Тканевые образцы после стандартной гистологической обработки окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, импрегнировали серебром по Футу, а также выполняли комплекс иммуногистохимических исследований с антителами к VEGF (эндотелиальный сосудистый фактор роста), VEGFR1 (Flt-1) (рецептор к эндотелиальному сосудистому фактору роста 1-го типа), VEGFR2 (KDR/Flk-1) (рецептор к эндотелиальному сосудистому фактору роста 2-го типа), VEGFR3 (Flt-4) (рецептор к эндотелиальному сосудистому фактору роста 3-го типа),  $\alpha$ -SMA (гладкомышечный  $\alpha$ -актин), подопланину, CD31 (молекула адгезии эндотелиоцитов), CD163 (рецептор, богатый цистеином, маркер макрофагов), PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток). Морфометрические показатели вычислялись с использованием ImageJ, National Institutes of Health (США). Показатели были выражены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение.

Как известно, в посттравматической регенерации костной ткани принято выделять три фазы: ранних посттравматических изменений, регенерации и функциональной адаптации [1, 2]. Исследованный нами материал позволил проанализировать гистогенетические процессы в первой фазе и в начале второй.

Фаза ранних посттравматических изменений (1–4-е сутки). Установлено, что наиболее ранним событием в ходе остеорепарации является миграция в область повреждения гетерогенной популяции макрофагов. С 1-х до 4-х суток среди массивных пучков нитей фибрина и множества гибнущих эритроцитов отмечается значительное увеличение количества макрофагов (с  $0,6 \pm 0,1$  до  $5,2 \pm 2,1$ ), которые становятся ведущим клеточным диффероном на этом сроке в полужидком объеме организующейся гематомы. В 90 % макрофагах определяется цитоплазматическая реакция с антителами к VEGF различной степени выраженности, что отражает активную цитокин-синтетическую функцию клеток.

На сроке 4 суток после перелома преимущественно в перикапиллярном пространстве, иногда в непосредственной близости от новообразованных сосудов, определяются немногочисленные клетки фибробластического дифферона, а также овальные одноядерные клетки, богатые слабоокисфильной цитоплазмой («полибласты», по терминологии А. А. Максимова). Индекс пролиферации (ИП) в перикапиллярных зонах составляет 66,6 %, что отражает активный митотический процесс клеточных элементов, мигрирующих в зону повреждения из новообразованных капилляров.

Фаза регенерации. Период активного ангиогенеза и формирования соединительнотканного матрикса (4–10-е сутки). К 5–7 суткам количество клеточного детрита значительно уменьшается – в центральных зонах гематомы встречаются лишь островки лизированных эритроцитов и нитей фибрина, что сопровождается нарастанием количества клеток макрофагального дифферона и достижением их максимального количества  $7,2 \pm 3,4$  к 6-м суткам. Доля положительных VEGF-клеток постепенно уменьшается к 10-м суткам с 91 % до 73 %, что, по-видимому, отражает снижение активности цитокин-синтетической функции и смену популяционного состава макрофагов.

При этом, как и в кожной ране, в течение репаративного остеогистогенеза происходит последовательная смена популяционного состава макрофагов – M1-

макрофаги, преобладающие на ранних этапах, постепенно сменяются популяцией M2-макрофагов, которые синтезируют противовоспалительные цитокины, такие как IL-10 [12]. В работе К. L. Spiller и соавт. (2014) показано, что наибольший уровень экспрессии ангиогенных факторов роста обеспечивают именно M1-макрофаги (помимо осуществления функции фагоцитоза), которые относятся к так называемому провоспалительному типу, в то время как M2-макрофаги обеспечивают продукцию MMP9-белка, который играет важную роль в процессе ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса на этапе «созревания» грануляционной ткани [13]. Происходит ли смена преимущественного типа макрофагов за счет миграции в область повреждения новых клеток макрофагального дифферона или благодаря инверсии фенотипа клеток уже имеющихся в гематоме, остается предметом дискуссии.

ИП клеток эндотелиального дифферона к 7-м суткам составляет время 77,5 %, мембранная экспрессия Flk-1 – 93 % клеток, что подчеркивает тесные молекулярные взаимодействия между эндотелиоцитами и цитокин-продуцирующими макрофагами. Активный процесс ангиогенеза идет параллельно со стремительным увеличением площади реактивно измененной волокнистой соединительной ткани, доля которой к 6-м суткам достигает 63,8 %, а к 10-м суткам практически вся площадь препарата представлена соединительной тканью разной степени дифференцированности. Клетки фибробластического дифферона распределены относительно равномерно по всей площади препарата, в том числе на значительном удалении от новообразованных сосудов, что, по-видимому, отражает активный процесс их миграции из периваскулярной зоны (рис. 1).

Ранние исследования на основе проведения корреляционного анализа клеточного состава сложного мультитканевого регенерата позволили выделить в эту фазу в качестве ведущего функционального клеточного ансамбля макрофагально-фибробласто-эндотелиальный регенерационный гистион [2]. При этом отмечается постепенное нарастание внутридифферонной гетероморфности клеток фибробластического ряда, что в совокупности с высоким ИП (63–74 %) и наличием экспрессии у 89 % клеток Flk-1 отражает важную роль VEGF-VEGFR регуляторной оси в формировании и цитофизиологии регенерационного макрофагально-фибробласто-эндотелиального гистиона (временной кооперации клеток, связанных функционально посредством преимущественно цитокиновых взаимодействий и нацеленной на реализацию того или иного этапа гистогенеза).

Образование плотного каркаса коллагеновых волокон, по-видимому, обеспечивает оптимальные условия для нейрогенеза – на 8-е сутки детектируются первые нервные волокна диаметром до 68 мкм, врастающие в организующуюся гематому.

Поиск структур, дающих положительную реакцию с антителами к подопазину, приводит к обнаружению эндотелиоцитов немногочисленных лимфатических сосудов диаметром до 76 мкм; следовательно, к этому времени в регенерате формируется дренажная система, обычно не учитываемая при оценке репаративных процессов.

Период раннего остеогистогенеза (10–12 сутки). К 10-м суткам практически весь объем параоссальной гематомы представлен соединительной тканью разной степени зрелости, доля которой составляет 80,3 % – лишь в отдельных участках

встречаются очаги клеточного детрита, который представлен гибнущими поперечно-полосатыми мышечными волокнами. Реактивно измененная соединительная ткань становится более дифференцированной, фибробласты активно синтезируют коллаген, коллагеновые волокна объединяются в пучки различной ориентации, фибробласты дифференцируются в терминально дифференцированные клеточные элементы фибробластического дифферона — фиброциты. Постепенное снижение к 12-м суткам ИП фибробластов до 54 % также отражает преобладание процессов дифференцировки над пролиферацией. Экспрессия Flk-1 и Flt-4 составляет соответственно 80 % и 82 %, что, по-видимому, свидетельствует о значимой роли VEGF не только в процессе пролиферации клеток фибробластического дифферона, но и в процессе их дифференцировки.

К 12-м суткам отмечается достоверное снижение общего числа сосудов до  $4,5 \pm 0,5$ , что в совокупности с уменьшением митотической активности эндотелиоцитов до 57,4 % и Flk-1-позитивных клеток на 15,2 % свидетельствует об угасании или стабилизации уровня ангиогенеза к этапу формирования ретикулофиброзной костной ткани в отстоящих от периоста участках параоссальных гематом. Таким образом, число сосудов, достигнув максимального количества на 7–8-е сутки, в дальнейшем начинает постепенно снижаться, что может быть обусловлено гибелью отдельных клеточных элементов части капилляров путем апоптоза.

На 10–12-е сутки в параоссальной гематоме формируются структуры ретикулофиброзной костной ткани, внутри и по периметру которых залегают преимущественно овальные клетки с широким ободком цитоплазмы — дифференцирующиеся остеобласты. Синтезируя коллагеновую основу межклеточного вещества, остеобласты образуют тонкие ажурные трабекулы и, по мере увеличения объема, сами включаются в их структуру, приобретая черты остеоцитарной дифференцировки. Новые экспериментальные работы с применением ингибиторов ангиогенеза у животных в модели перелома трубчатой кости убедительно показали, что введение препарата TNP-470 на 1-е сутки после перелома обеспечивает выраженное замедление или полностью предотвращает формирование ретикулофиброзной костной ткани [9]. Как было показано в экспериментальной модели нестабильного перелома, одним из ведущих факторов нарушения консолидации при неадекватной фиксации перелома является снижение концентрации mP-NKvWF (фактор фон Виллебранда), Ang1 и Ang2 (ангиогенин 1 и ангиогенин 2), VEGF, что сопровождается достоверным угнетением роста и образования сосудов в области повреждения [26]. Напротив, введение в область репаративной регенерации VEGF индуцирует ангиогенез и обеспечивает достоверное сокращение сроков формирования ретикулофиброзной ткани [11]. Нами установлено, что экспрессия рецепторов VEGF имеется не только на мембране подавляющей части эндотелиоцитов, но и у других видов клеток, включая остеобласты, что позволяет рассматривать VEGF не только как косвенный, но и как прямой индуктор остеогистогенеза. Наличие экспрессии Flt-1 и Flk-4 у более чем 90 % клеток остеобластического дифферона подтверждает роль VEGF-VEGFR регуляторной оси в процессах их гистогенеза и позволяют обосновать превалирующее значение остеобласто-эндотелиального гистиона на этом этапе процесса гистогенеза,

что ранее подчеркивалось профессором В. Г. Гололобовым [2]. Данное положение легло в основу разработки биотехнологических средств оптимизации репаративного остеогенеза, предназначенных для клинической практики [6, 7].

Антитела к PCNA маркируют ядра 30 % клеток остеобластического дифферона, которые располагаются преимущественно по периферии структур ретикулофиброзной ткани, что демонстрирует снижение митотической активности на пути дифференцировки от клеток-предшественниц до терминальной формы гистогенетического ряда - остеокита. Положительное маркирование части остеобластов антителами к  $\alpha$ -SMA отражает наличие сократительного аппарата в цитоскелете этих клеток, что позволяет предполагать возможность их миграционной активности.

Полученные результаты анализа посттравматического остеогистогенеза в параоссальных гематомах у человека соответствуют ранее вскрытым закономерностям этого процесса у экспериментальных животных (и подтверждают их) и создают дальнейшие предпосылки к разработке новых средств оптимизации репаративной регенерации костной ткани.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол\_a № 16-34-00440.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гололобов В. Г. Регенерация костной ткани при заживлении огнестрельных переломов. СПб.: Петербург-XXI век, 1997.
2. Гололобов В. Г. Посттравматическая регенерация костной ткани. Современный взгляд на проблему / Труды Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова. 2004. Т. 257. С. 94–109.
3. Гололобов В. Г., Деев Р. В. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон // Морфология. 2003. № 1. С. 1–19.
4. Данилов Р. К., Боровая Т. Г., Клочков Н. Д. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей (некоторые итоги XX века и перспективы дальнейших исследований) // Морфология. 2000. Т. 118, № 4. С. 7–16.
5. Клишов А. А. Гистогенетический аспект проблемы регенерации // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1981. Т. 80, № 2. С. 84–89.
6. Bozo I. Y., Deev R. V., Drobyshev A. Y. et al. World's first clinical case of gene-activated bone substitute application case // Rep. Dent. 2016. ID 8648949. doi.10.1155/2016/8648949.
7. Deev R. V., Drobyshev A. Y., Bozo I. Y. et al. Ordinary and activated bone grafts: applied classification and the main features // BioMedRes. Int. 2015. ID 365050. doi.10.1155/2015/365050.
8. Bhandari M., Guyatt G. H., Tong D. et al. Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and meta-analysis // J. Orthop. Trauma. 2000. Vol. 14. P. 2–9.
9. Hausman M. R., Schaffler M. B., Majeska R. J. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis // Bone. 2001. Vol. 29(6). P. 560–564.
10. Lienau J., Schmidt-Bleek K., Peters A. et al. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing // J. Orthop. Res. 2009. Vol. 27(9). P. 1133–1140.

11. *Ogilvie C. M., Lu C., Marcucio R. et al.* Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model // *Iowa Orthop. J.* 2012. Vol. 32. P. 90–94.
12. *Raggatt L. J., Wulschleger M. E., Alexander K. A. et al.* Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification // *Am. J. Pathol.* 2014. Vol. 184. P. 3192–3204.
13. *Spiller K. L., Anfang R. R., Spiller K. J.* The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds // *Biomater.* 2014. Vol. 35(15). P. 4477–4488.
14. *Zura R., Xiong Z., Einhorn T. et al.* Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones // *JAMA Surg.* 2016. Vol. 16, № 15(11). ID e162775. doi. 10.1001/jamasurg.2016.2775.

*Попрядухин П. В.<sup>1</sup>, Юкина Г. Ю.<sup>2</sup>,  
Попов Г. И.<sup>2</sup>, Юдин В. Е.<sup>3</sup>*

## **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОРЕЗОРБЦИИ ПРОТЕЗОВ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДНЫХ НАНОВОЛОКОН**

<sup>1</sup>*Лаборатория «Механика полимеров и композиционных материалов» (заведующий – д. физ.-мат. н. В. Е. Юдин) Института высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, e-mail: pavel-pn@mail.ru;*

<sup>2</sup>*Лаборатория патоморфологии НИЦ (заведующая – к. б. н. Г. Ю. Юкина) Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, e-mail: pipson@inbox.ru;*

<sup>3</sup>*Лаборатория «Полимерные материалы для тканевой инженерии и трансплантологии» (заведующий – д. физ.-мат. н. В. Е. Юдин) Санкт-Петербургского государственного политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, e-mail: yudin@hq.macro.ru*

---

В современной сосудистой хирургии остается нерешенной проблема сосудистых протезов малого диаметра. Низкие показатели проходимости полимерных протезов диаметром менее 5 мм связывают, прежде всего, с развитием гиперплазии неоинтимы в зоне анастомозов, отсутствием эндотелиальной выстилки на внутренней поверхности протезов и тромбообразованием [1,2]. Одним из подходов к созданию искусственного сосуда является имплантация в живой организм полимерной матрицы, в которую из окружающих тканей мигрируют клетки, заполняя весь его объем. Таким образом, идет процесс формирования тканей и параллельно происходит резорбция полимерного импланта. Одним из перспективных методов получения полимерных сосудистых имплантов является метод электроформования. Метод позволяет получать материалы на основе нано- и микроволокон, обладающие высокой пористостью и удельной поверхностью, что необходимо для миграции и пролиферации клеток в объеме имплантата, при сохранении его герметичности по отношению к крови [3].