

Таким образом, при механическом повреждении исчерченной мускулатуры пищевода происходят процессы, характерные для мышц локомоторного аппарата. Посттравматическая регенерация мышц пищевода имеет этапы, типичные для регенерации скелетных мышц: распад, дифференцировка, пролиферация, вторичная дифференцировка. Различия во временных показателях этапов можно объяснить органной специфичностью и способом нанесения повреждения. Регенерационные процессы в исчерченной мускулатуре пищевода характеризуются обязательным участием миосателлитоцитов. Их участие в качестве источника при заживлении скелетных мышц показано во многих работах и может считаться признаком, имеющим тканевую детерминацию.

Бозо И. Я.¹, Деев Р. В.¹, Цупкина Н. В.², Гребнев А. Р.¹, Пинаев Г. П.²

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ЭКВИВАЛЕНТА ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ ДЕФЕКТОВ ДЛИННЫХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ

Кафедра нормальной анатомии (заведующий – проф. Д. В. Баженов) Тверской государственной медицинской академии, Тверь, e-mail: bajenovd@mail.ru

*¹ Кафедра патологической анатомии (начальник – проф. С. А. Повзун)
Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург.*

*² Отдел клеточных культур (заведующий – проф. Г. П. Пинаев)
Института цитологии РАН, Санкт-Петербург*

Лечение пациентов со значительными повреждениями костей – костными дефектами – является проблемным вопросом травматологии и ортопедии, так как зачастую приводит к неудовлетворительным анатомо-функциональным результатам. В этой связи активно разрабатывается биотехнологическое направление в лечении данной категории пациентов, призванное не только оптимизировать ход репаративного остеогенеза, неадекватного в условиях объемных повреждений и утраты части камбиальных резервов, но и восполнить, расширить репаративный потенциал костной ткани за счет привнесения дополнительных клеточных источников регенерации.

Известно, что репаративная регенерация костной ткани осуществляется за счет малодифференцированных клеток, занимающих в структуре остеоцитарного дифферона предшествующее неделящимся остеообластам положение [2]. В состав камбиального резерва входят мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), локализованные, главным образом, в красном костном мозге и, по некоторым данным, сопровождающие практически повсеместно сосуды микроциркуляторного русла [5], а также – остеогенные клетки внутреннего слоя периоста и каналов остеонов. При этом на процесс остеогенеза, как показано *in vitro* и в экспериментах с гетеротопическим костеобразованием, оказывают влияние факторы генетического, системного (гормоны и вещества с гормоноподобным действием) и локального (цитокины) уровней регуляции [2, 3].

В ряде исследований показано, что камбиальным клеткам для проявления своих дифференцировочных потенциалов необходима организация в виде трехмерной структуры. Следовательно, необходим носитель, фиксирующий на своей поверхности клетки в течение определенного времени [4, 6]. Введение взвеси клеток в область дефекта не имеет значимой клинической эффективности [8]. В этой связи реализация методов клеточных технологий в рамках травматологии и ортопедии направлена на создание тканеинженерных эквивалентов костной ткани (ТИЭКТ), пригодных для дальнейшей трансплантации в область костного дефекта. ТИЭКТ (костный графт) — это результат интеграции малодифференцированных клеток, коммитированных по остеобластической линии дифференцировки, с носителем из костно-замещающего материала. Функция ТИЭКТ состоит в доставке максимального количества клеток в область дефекта, обеспечении оптимальной адгезии к материалу-носителю (иммобилизация) для сохранения их функционально активного состояния в костной ране, выполнении роли остеокондуктора. При этом механизмы воздействия ТИЭКТ на репаративный процесс в костной ране остаются до конца не исследованными.

К настоящему времени опубликованы некоторые результаты исследований, в основном зарубежных авторов, описывающих экспериментальную апробацию различных ТИЭКТ, что указывает, с одной стороны, на активность разработки биотехнологического направления, клиническую и коммерческую перспективность, а с другой — на значительность проблем экспериментального обоснования, несовершенство материалов и методов, противоречивость получаемых результатов и сдержанность в их оценке. В этой связи предпринято исследование, нацеленное на создание ТИЭКТ на основе стромальных клеток с потенциальными ММСК и носителя из деминерализованного костного матрикса (ДКМ) для его дальнейшего применения в программе комплексного лечения пациентов с объемными повреждениями костей.

Исследование состояло из двух частей. Первая — лабораторная — включала отработку и обоснование основных этапов создания ТИЭКТ, вторая — экспериментально-морфологическая — направлена на оценку биобезопасности и эффективности его участия в оптимизации репаративного остеогенеза *in vivo*.

Результаты первой части были опубликованы ранее и включали описание получения клеточного материала, подтверждение остеогенной дифференцировки клеток *in vitro*, обработку носителя и совмещение его с клеточной культурой с подтверждением адекватности адгезии [1].

Материал и методы исследования. Этап оценки эффективности ТИЭКТ в оптимизации репаративной регенерации *in vivo* выполнен на 36 кроликах массой 2,5–3 кг, разделенных на три группы. Под местным обезболиванием после подготовки операционного поля и премедикации (0,5 мл 2%-ного раствора димедрола; 1,0 мл 50%-ного раствора анальгина) выполняли послойный разрез кожи, подкожной жировой клетчатки, фасции по внутренней поверхности большеберцовой кости и удаляли ее часть протяженностью 2 см. Выполняли интрамедуллярную фиксацию костных опилов с установкой П-образного дистрактора, фиксирующего диастаз.

Животным первой группы в область повреждения вводили ТИЭКТ с аутогенным клеточным компонентом; второй (контроль-1) – только носитель из ДКМ. В контроле-2 консолидация происходила без осуществления дополнительных лечебных мероприятий.

Животных выводили из эксперимента на 30, 60, 90, 120 и 150-е сут. Некоторым кроликам первой группы трансплантировался ТИЭКТ с клетками, меченными флюорохромом РКН-26. В этих случаях на 18-е сут из области регенерата забирался биоптат с последующей маркировкой ДНК всех клеток 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Двойная метка (РКН-26 и DAPI) позволяла установить расположение привнесенных клеток в составе регенерата.

Выполнялись рентгенография и компьютерная томография макропрепаратов тазовых конечностей от всех животных. В последующем осуществляли рутинную обработку материала для гистологического исследования, изготавливали гистотопограммы, включавшие область регенерации. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты исследования и их обсуждение. Оперативные вмешательства во всех случаях прошли без осложнений, однако в раннем послеоперационном периоде у трех животных развилась раневая инфекция, в связи с чем эти кролики были исключены из эксперимента. В первые сутки после выполнения операции животные были малоподвижны, однако питались в полном объеме. К 5-м сут кролики начинали частично опираться на поврежденные конечности, а полная опороспособность наблюдалась со срока в 20 сут во всех группах.

По данным лучевых методов исследований (рис. 1, 2), у животных после трансплантации ТИЭКТ дефект после 60 сут был полностью заполнен мощным

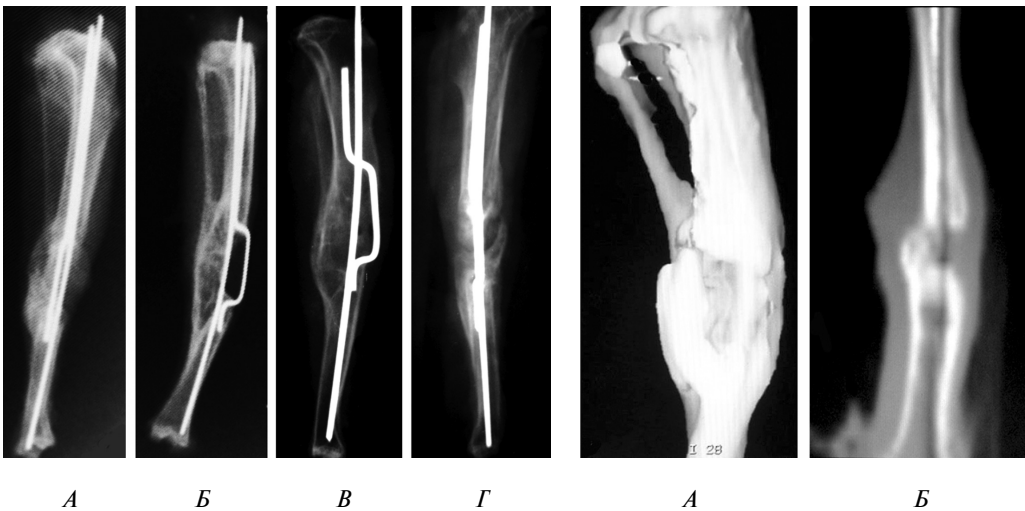


Рис. 1. Рентгенограммы костей голени: А – 120 сут, первая группа; Б – 150 сут, первая группа; В – 120 сут, контроль-1; Г – 150 сут, контроль-2

Рис. 2. Компьютерные томограммы костей голени: А – 3D-реконструкция костного регенерата, 60 сут, первая группа; Б – 2D-реконструкция большеберцовой кости, 60 сут, контроль-1

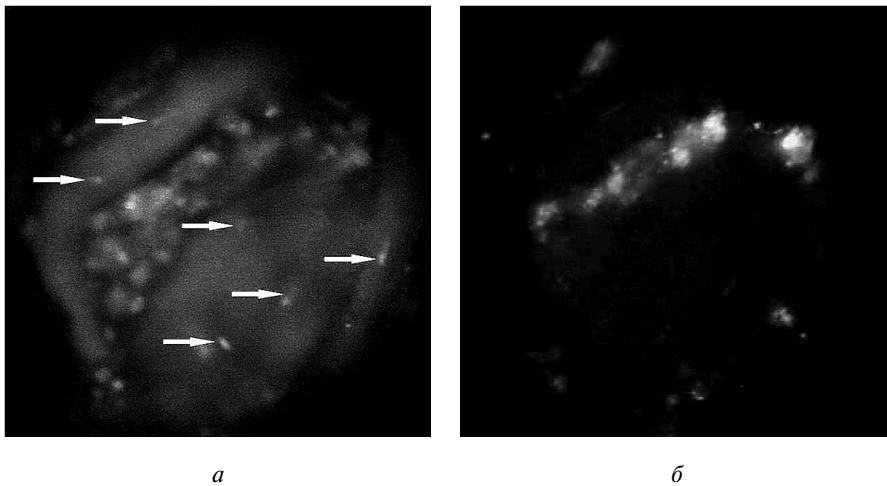
костным регенератом, а полное восстановление целостности диафиза большеберцовой кости происходило к 90 сут. Через 120 сут регенерат, заполнивший область дефекта и огибающий П-образный дистрактор, по рентгенконтрастности не отличался от компактного вещества длинных трубчатых костей. В группе с применением ДКМ без клеток (контроль-1), как и в контроле-2, лишь к 120-м сут определялся ремоделирующийся костный регенерат. В ряде случаев определялся диастаз в 2–3 мм между проксимальным и дистальным опилами кости в области дефекта. Даже к 150-м сут большая часть дефекта была заполнена тканью низкой рентгенконтрастности, опилены характеризовались состоянием остеосклероза, в ряде случаев формировались ложные суставы.

При гистологическом анализе показано, что к 30-м сут эксперимента у животных первой группы зона дефекта заполнена мощно развитой ретикулофиброзной костной тканью, формирующей разветвленную сеть костных трабекул, как в периостальной, интермедиарной, так и эндостальной частях регенерата. Между трабекулами выявлена реактивно измененная рыхлая волокнистая соединительная ткань (РВСТ), а в эндостальной части – участки кроветворения. Материал носителя (ДКМ) был частично резорбирован. К 60-м сут носитель был практически полностью резорбирован, однако его отдельные фрагменты являлись непосредственным источником новообразованных костных трабекул регенерата. На более поздних сроках происходили процессы закономерного ремоделирования костного регенерата с формированием пластинчатой костной ткани в области воссозданного диафиза. Обращает на себя внимание, что при заживлении дефекта в этих условиях в составе регенерата на всех сроках отсутствовала хрящевая ткань.

Репаративный процесс у животных контрольных групп протекал сходно. Трансплантированный ДКМ не замещался костным регенератом. Через 60 сут сохранившиеся балки трансплантата были замурованы в обширные поля плотной волокнистой соединительной (рубцовой) ткани. Источником репаративной регенерации являлись остеогенные элементы периоста и эндоста проксимального и дистального опилов, за счет которых формировались разрастания ретикулофиброзной костной ткани; в отдаленных участках – через стадию костнохрящевого регенерата. В связи с этим процессом несколько уменьшался диастаз между опилами. При этом в центральных отделах дефекта, заполненного ДКМ, очаги остеогенеза обнаружены не были. Это приводило на поздних сроках к формированию ложных суставов.

При проведении флуоресцентной микроскопии биоптатов от животных первой серии после пересадки меченых клеток установлено, что трансплантированные в составе ТИЭКТ клетки были жизнеспособными и находились в составе костного регенерата. Однако их локализация в межтрабекулярных пространствах и отсутствие метки в остеоцитах и остеобластах ретикулофиброзной костной ткани свидетельствовало о развитии костного регенерата из местных камбиальных источников (рис. 3).

Результаты выполненного исследования согласуются с ранее полученными данными в части, касающейся более быстрого и полноценного в гистотипическом отношении репаративного остеогенеза при использовании ТИЭКТ [9]. Примечательно, что очаги активного остеогенеза обнаружены не только в непо-



*Рис. 3. Участок костного регенерата у животного первой группы, 18 сут:
 а – флуоресценция DAPI в ядрах (стрелками указаны ядра остеоцитов);
 б – флуоресценция РКН-26 в пересаженных клетках (то же поле зрения). ×100*

средственной связи с известными источниками, но и в толще ТИЭКТ. Кроме того, реализация репаративного остеогенеза при протяженном дефекте, восполненном ТИЭКТ без стадии смешанного костно-хрящевого регенерата, указывает на достаточные условия для дифференцировки остеогенных предшественников в области костной раны [3, 7]. При этом остается не до конца решенным вопрос об источнике остеогенных клеток-предшественниц. Теоретически можно предположить два различных варианта: непосредственная пролиферация и дифференцировка *in situ* трансплантированных на носителе клеток, либо опосредованное биологически активными веществами (БАВ) и факторами роста индуцирующее влияние на клетки местного камбиального резерва. С помощью метки РКН-26 удалось установить, что трансплантированные клетки в регенерате присутствуют в значительном количестве, однако дифференцировавшихся в остеобласты и остециты новообразованных костных трабекул клеток из их числа не выявлено. Следовательно, полученные данные свидетельствуют об опосредованном БАВ влиянии трансплантированных клеток на репаративный остеогенез, что соотносится с мнением других исследователей [7, 10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев Р. В., Гололобов В. Г., Цупкина Н. В. и др. Гистогенетический принцип создания тканеинженерных конструкций скелетных тканей. Вопросы морфологии XXI века. Вып. 1: Сборник научных трудов, посвященный 100-летию кафедры медицинской биологии СПбГМА им. И. И. Мечникова / Под ред. докт. мед. наук С. В. Костюкевича. СПб.: СПбГМА им. И. И. Мечникова; изд-во ДЕАН, 2008. С. 114–119.
2. Гололобов В. Г., Деев Р. В. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон // Морфология. 2003. Т. 123. № 1. С. 9–19.

3. Гололобов В. Г., Дулаев А. К., Деев Р. В. и др. Морфофункциональная организация, реактивность и регенерация костной ткани / Под ред. проф. Р. К. Данилова, проф. В. М. Шаповалова. – СПб.: ВМедА, 2006.
4. Bancroft G. N., Sikavitsas V. I., van den Dolder J. et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. N 20. P. 12600–12605.
5. Crisan M., Yap S., Casteilla L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // Cell Stem Cell. 2008. Vol. 3. P. 301–313.
6. de Bruijn J. D., van den Brink I., Mendes S. et al. Bone induction by implants coated with cultured osteogenic bone marrow cells // Adv. Dent. Res. 1999. Vol. 13. P. 74–81.
7. Kanczler J. M., Oreffo R. O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone // Eur. Cell Mater. 2008. Vol. 15. P. 100–114.
8. Kuznetsov S. A., Mankani M. H., Robey P. G. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation // Transplantation. 2000. Vol. 12. P. 1780–1787.
9. Mastrogiacomo M., Papadimitropoulos A., Cedola A. et al. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption // Biomaterials. 2007. Vol. 7. P. 1376–1384.
10. Kraus K. H., Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration // Vet Surg. 2006. Vol. 3. P. 232–242.

Боровая Т. Г.¹, Диденко Л. В.², Шевлягина Н. В.²

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОВО-ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ГИСТИОНОВ В МОДЕЛИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ *Кафедра морфологии медицинского института ИАТЭ, Обнинск*

² *НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва*

Генитальная форма рецидивирующей герпес-вирусной инфекции (ГРГИ) вызывается вирусом простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) и проявляется периодическими высыпаниями и воспалением в области слизистой оболочки наружных гениталий. Как и другие герпес-вирусные инфекции, характеризуется пожизненным сохранением вируса в спинно-мозговых узлах, избирательным поражением эпителиальных тканей, ремиссией в стадии обострения. Чаше встречается у женщин, что придает рассматриваемой проблеме особую актуальность. Женские половые клетки, в отличие от мужских, относятся к стационарным (необновляющимся) клеточным популяциям; их число в яичниках прогрессивно убывает по причине происходящих овуляций и перманентной физиологической гибели (атрезии). В этой связи действие любого повреждающего агента (в том числе предполагаемое