

Ультроструктурные особенности ангиогенеза при заживлении переломов

В.И. Шевцов, Ю.М. Ирьянов

Ultrastructural peculiarities of angiogenesis in healing of fractures

V.I. Shevtsov, Y.M. Irianov

Государственное учреждение науки

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган
(Генеральный директор — академик РАМТН д.м.н. профессор, заслуженный деятель науки РФ В.И. Шевцов)

Впервые выявлен ряд неизвестных ранее особенностей ангиогенеза в регенератах большеберцовых костей собак в условиях остеосинтеза аппаратом Илизарова. Описана ультроструктура эндотелиоцитов с экспрессией миграционного фенотипа и показана их роль в предотвращении жировой эмболии. Установлено значение мигрирующих средних лимфоцитов в формировании почеч роста сосудов в направлении ангиогенного стимула. Выявлены и описаны ультроструктурные особенности мобильной части сосудистых почеч - кластеров клеток, осуществляющих совместное движение по направлению градиента концентраций стимуляторов ангиогенеза. Установлены клеточные и внеклеточные механизмы образования просветов во вновь сформированных участках сосудов. Показано, что дифференцирующиеся остеогенные клетки являются источником стимуляторов ангиогенеза.

Ключевые слова: регенерат, перелом, чрескостный остеосинтез, воспаление, ангиогенез, ультроструктура.

A number of unknown before peculiarities of angiogenesis in canine tibial regenerated bones in the conditions of osteosynthesis with the Ilizarov apparatus has been revealed for the first time. Ultrastructure of endotheliocytes with expression of migration phenotype is described and their role in fat embolism prevention is shown. Significance of migrating medium lymphocytes is determined in formation of vascular growth buds in the direction of angiogenic stimulus. Ultrastructural peculiarities of vascular buds mobile part are revealed and described - those of cellular clusters, moving in common to concentration gradient of angiogenesis stimulants. Formations of lumens in newly formed parts of vessels are established as well as cellular and extracellular mechanisms. It is demonstrated, that differentiating osteogenic cells are a source of angiogenesis stimulants.

Keywords: regenerated bone, fracture, transosseous osteosynthesis, inflammation, angiogenesis, ultrastructure.

Процесс заживления переломов осуществляется, как известно, в несколько этапов. По мнению некоторых авторов [1], таких этапов можно выделить шесть: образование гематомы и ее тромбирование, организация кровяного сгустка, образование фиброзного предкостного регенерата, формирование первичного регенерата кости из незрелой костной ткани (ретикулофиброзной и грубоволокнистой), образование вторичного регенерата кости зрелой тонковолокни-

стой пластинчатой костной тканью, функциональная реконструкция и органотипическая перестройка регенератов. Первые три из этих этапов, являющиеся результатом травматического воспаления, описаны нами ранее (В.И. Шевцов, Ю.М. Ирьянов, 1998). В настоящей работе исследованы особенности ангиогенеза на заключительной, репаративной стадии воспалительного процесса при переломах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучены регенераты, формирующиеся через 3 и 5 суток после флексии остеоклазии диафизов большеберцовых костей 9 взрослых собак и остеосинтеза аппаратом Илизарова*.

Материал исследовали при помощи методов световой микроскопии полутонких срезов, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

* Животных оперировали к.м.н.: Н.В. Петровская, И.И. Мартель, А.А. Шрейнер.

Известно, что именно воспаление в подавляющем большинстве случаев определяет последовательность событий при ангиогенезе, а непосредственная миграция эндотелиоцитов по направлению к ангиогенному стимулу является первым, начальным этапом образования новых кровеносных сосудов [2]. При этом многочисленные полиморфные и гетерогенные популяции клеток в зоне воспаления, а также разнообразные физические и химические воздействия могут принимать участие в регуляции процессов ангиогенеза. Установлено [3], что стимуляторами ангиогенеза являются многие физические факторы: гипоксия, отек ткани, вазодилатация и др., и многочисленные химические соединения: вазоактивные вещества, гепарин, фибрин и продукты его деградации, секреты, продуцируемые нейтрофилами, макрофагами, лимфоцитами, тромбоцитами, а также факторы роста фибробластов, эндотелиоцитов, тромбоцитов и др. Следует отметить важную роль тучных клеток как стимуляторов ангиогенеза. Показано, что секретируемый ими гистамин обладает выраженным митогенным эффектом на эндотелиоциты, а гепарин стимулирует миграцию эндотелиоцитов и потенцирует действие других стимуляторов ангиогенеза [2, 4].

Различают пять стадий острого воспалительного процесса [3]. Первая стадия - вазодилатация в зоне воспаления, увеличение объема крови (гиперемия) и возрастание ее текучести. Вторая стадия - замедление кровотока, увеличение проницаемости микрососудов, агрегация эритроцитов, адгезия лейкоцитов и тромбоцитов. Третья стадия - диапедез эритроцитов, лейкоцитов и лимфоцитов, экссудация плазмы через стенки капилляров и венул, почти полная остановка кровотока. Четвертая стадия - развертывание процессов хемотаксиса и фагоцитоза. Пятая стадия - репаративно-восстановительные процессы.

Проведенные нами исследования показали, что при заживлении переломов различные этапы воспаления по времени накладываются друг на друга, и начальные стадии ангиогенеза при репаративно-восстановительных процессах совпадают с этапом активного хемотаксиса и фагоцитоза, о чем свидетельствует многочисленность функционально активных макрофагов в зоне перелома в этот период.

Макрофагальной реакции предшествуют явления хемотаксиса подвижных фагоцитов и их предшественников: нейтрофилов и моноцитов. Они мигрируют из сосудов и инфильтрируют воспалительный экссудат особенно интенсивно на третьи сутки после перелома. При этом, как известно, они секретируют многочисленные

ферменты, среди которых можно отметить лизоцим, кислые лизосомные гидролазы, кислую и щелочную фосфатазы, коллагеназу, эластазу и другие протеазы, липазы, рибо-и дезоксирибонуклеазы и др., а также синтезируют и выделяют в межклеточное пространство гликозаминогликаны и протеогликаны [3, 5]. Некоторые из этих веществ обладают свойством хемоаттрактантов и стимуляторов ангиогенеза.

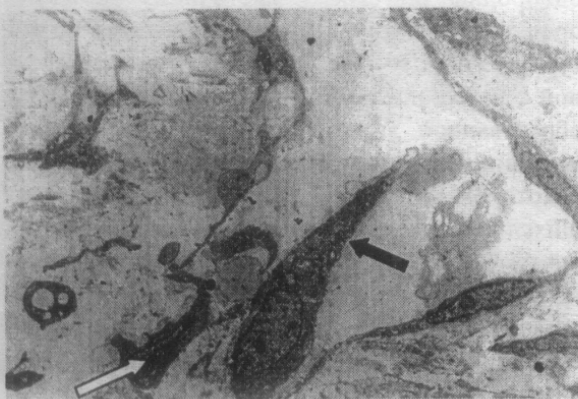
Хемотаксическими свойствами для нейтрофилов и моноцитов обладает также система комплемента, продукты метаболизма и распада тканей, ряд ферментов, находящихся в сыворотке крови, факторы, связанные с системой свертывания крови и гемостазом и др. [3, 4]. По нашим данным, активными хемотаксическими свойствами в зоне перелома обладают также плазма крови и ее преципитаты - для моноцитарных клеток и мононуклеарных макрофагов, экстравазальные эритроциты - для ангиобластов, эндотелиоцитов и макрофагов, дезинтегрированные и кальцифицированные адипоциты костного мозга - для макрофагов и эндотелиоцитов, иммунные комплексы - для нейтрофилов и макрофагов.

Нами установлено, что на начальном этапе хемотаксиса наблюдается краевое стояние и адгезия на люминальной поверхности эндотелия клеток, ультраструктурно сходных со средними лимфоцитами [5] (рис. 1). Они проходят ряд трансформаций и приобретают конусовидную форму или вид теннисной ракетки. Подобную форму, по данным некоторых авторов [5], приобретают живые лимфоциты, активно движущиеся в культуре ткани.

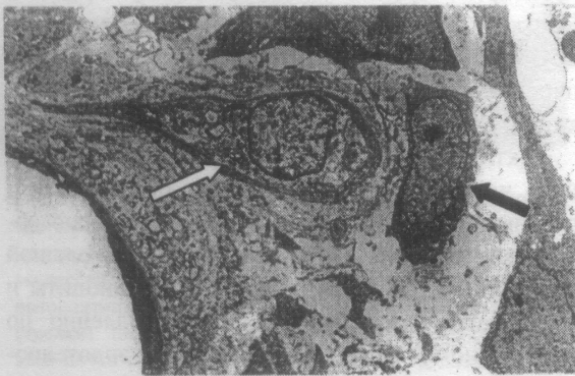
Проведенные исследования показали, что, прикрепившись к эндотелию, мигрирующие лимфоциты приобретают головную и хвостовую части. В их головном отделе располагается округлое эллипсовидное ядро, содержащее 1-2 небольших ядрышка и окруженное узким ободком цитоплазмы. Хвостовой конец мигрирующих лимфоцитов образован тяжом цитоплазм, вытянутым в направлении противоположном движению клеток и содержащим незначительное количество органелл. Ультраструктура средних лимфоцитов свидетельствует об их некоторой дифференцированности: в ядрах присутствует эухроматин, а в цитоплазме - цистерны эндоплазматической сети и митохондрии.

Средние лимфоциты осуществляют плотный, на значительном протяжении контакт с эндотелием и, находясь в просвете сосудов, в результате активного поступательного движения выполняют роль своеобразных "клеточных дистракторов", вызывая напряжение и растяжение сосудистой стенки. Оказывая давление на эндотелио-

циты в участках адгезии, они частично повреждают их и нарушают интегрированность эндотелиального пласта. Известно, что из поврежденных эндотелиоцитов высвобождается ряд ростовых факторов и ферментов (активатор фибриногена, плазмин-протеаза, коллагеназа и др.), которые разрыхляют и разрушают базальную мембрану, способствуя процессам миграции эндотелиоцитов из стенки сосуда в периваскулярное пространство [2]. Нарушение целостности эндотелия стимулирует митотическое деление и рост эндотелиоцитов, обеспечивает формирование сосудистых почек. Механическое растяжение сосудистой стенки, как было показано нами ранее [6, 7] и в дальнейшем подтверждено другими авторами, [2] является мощным индуктором ангиогенеза, стимулирующим рост сосудов и гистогенез сосудистой стенки.



а



б

Рис. 1. Образование сосудистых почек через 3 (а) и 5 (б) суток после перелома. Средние лимфоциты (короткая стрелка) и миграционные эндотелиоциты (длинная стрелка) приобретают вытянутую конусовидную форму, характерную для активно движущихся клеток. К дифференцирующимся остеогенным клеткам - преостеобlastам (рис. 1б, черная стрелка) от материнского сосуда отрастает сосудистая почка каплевидной формы, в просвете которой располагается лимфоцит (белая стрелка). Электронограммы. Увеличение 6000

Проведенные в данной работе исследования показали, что в участках адгезии лимфоцитов наблюдается образование бухтообразных выпячиваний сосудистой стенки (рис. 1а), что является начальным этапом формирования почек роста сосудов, ориентированных по направлению градиента концентраций хемоаттрактантов,

появляющихся в результате воспалительных и репаративных процессов в зоне перелома.

Под воздействием растягивающих усилий лимфоцитов в участках их адгезии сосудистые почки ответвляются в направлении, перпендикулярном ориентации материнских сосудов (синусоидных капилляров и венул), удлиняются, приобретают каплевидную форму и направляются к новообразующимся костным трабекулам, приближаясь на расстояние 0,5-1 мкм к остеогенным клеткам - преостеобlastам и остеобlastам (рис. 1б). Дифференцирующиеся остеогенные клетки, таким образом, являются мощным источником ангиогенных стимулов и хемоаттрактантов для лимфоцитов и эндотелиоцитов.

Проведенные нами исследования показали, что в процессе подготовки к миграции эндотелиоциты приобретают характерный миграционный клеточный фенотип (рис. 2, 4), главной особенностью которого является наличие у клеток длинных, прободающих базальную мембрану цитоплазматических выростов - цитоподий на стороне, обращенной к ангиогенному стимулу. Цитоплазма мигрирующих эндотелиоцитов уплотнена, осмиофильна, содержит многочисленные свободные рибосомы и полисомы, тогда как микропиноцитозные везикулы, напротив, отсутствуют или весьма немногочисленны. Ядра содержат крупные, хорошо выраженные ядрышки и находятся в состоянии гиперфункции, о чем свидетельствует наличие многочисленных инвагинаций кариолеммы, скоплений эухроматина в кариоплазме и тонкого сплошного слоя гетерохроматина у внутреннего листка кариолеммы.



Рис. 2. Начальный этап формирования сосудистой почки через 3 суток после перелома. Эндотелиоцит с экспрессией миграционного фенотипа (стрелка) в вершине почки. Электронограмма. Увеличение 10000

Отделение эндотелиоцитов от основного эндотелиального слоя материнских сосудов осуществляется в участках, где наблюдается адгезия моноцитоподобных клеток и происходит под углом, близким к прямому (рис. 3). Дезинтеграция эндотелиального пласта способствует мито-

тическому делению мигрирующих эндотелиоцитов, которые формируют сосудистые почки и капиллярные терминалы, растущие по градиенту концентраций хемоаттрактантов. В эндотелиоцитах у основания сосудистых почек отмечается многочисленность структур белоксинтезирующего аппарата: свободных и связанных с мембранами цитоплазматической сети рибосом и полисом, а также митохондрий. Наблюдается появление телец Вейбеля-Паладе и мелкоячеистой сети микрофиламентов цитоскелета. Между мигрирующими эндотелиоцитами формируются специализированные межклеточные соединения с плотными замыкающими комплексами, образуя так называемые зоны замыкания (*zonulae occludentes*) [5], что, как известно [8], обеспечивает разрастание эндотелиальных клеток с преодолением ими сопротивления со стороны геля интерстициальных пространств. Микропиноцитозные везикулы в эндотелиоцитах почек роста немногочисленны или полностью отсутствуют, что является показателем малой дифференцированности эндотелиальных клеток этих участков капилляров [9].

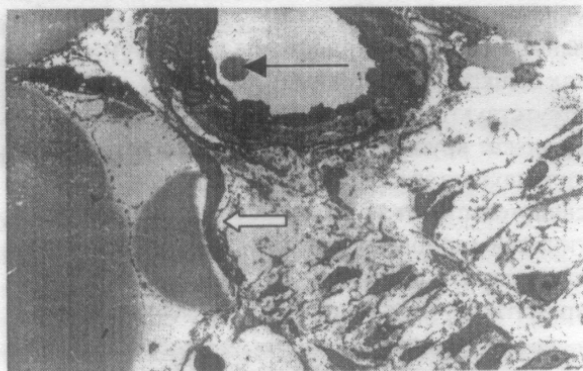


Рис. 3. Отделения тяжа миграционных эндотелиоцитов (белая стрелка) от материнского сосуда через 5 суток после перелома. Липидное включение в артериоле (черная стрелка). Электронограмма. Увеличение 2000

Ядра эндотелиоцитов в капиллярных почках имеют эллипсоидную или веретеновидную форму, глубокие инвагинации и содержат скопления гетерохроматина у внутреннего листка ядерной мембраны; при этом наружный листок кариеолеммы почти на всем протяжении покрыт рибосомами.

Базальная мембрана вокруг капиллярных почек отсутствует и появляется локальными участками лишь в зоне более зрелых капиллярных терминалов, где располагаются перициты и формируются перицито-эндотелиальные контакты, участвующие, как известно [9], в регуляции процессов новообразования капилляров.

Тяжи мигрирующих эндотелиоцитов и новообразованные капиллярные терминалы распространяются вокруг экссудатов плазмы, дезинтегрированных адипоцитов и скоплений экстра-

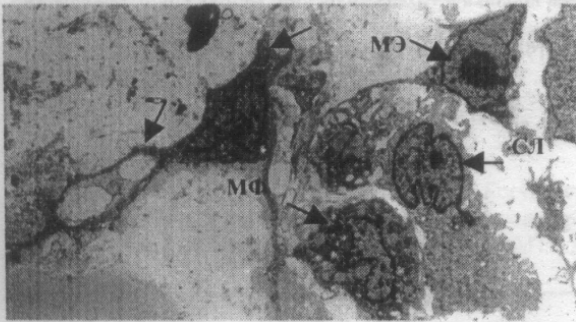
вазальных эритроцитов (рис. 3). Ферментные системы эндотелиальных клеток капилляров и венул расщепляют липидные образования костного мозга в зоне перелома и предотвращают, таким образом, появление крупных жировых скоплений в сосудах артериального звена. Благодаря этому в артериолах и мелких артериях в зоне перелома отмечается появление лишь единичных мелких липидных капель (рис. 3), сопоставимых по размеру с эритроцитами и не перекрывающих просвет сосудов, тогда как в сосудах капиллярного звена и в венах постоянно встречаются через 3 и 5 суток после перелома значительно более крупные жировые образования, состоящие из нескольких сливающихся липидных капель.

Проведенные нами исследования позволили впервые показать, что почки роста сосудов неоднородны по своему клеточному составу и представляют собой двухкомпонентную структурную систему (рис. 4). Она состоит из связанной с материнским сосудом капиллярной почки, образованной эндотелиоцитами с экспрессией миграционного фенотипа, и расположенным на некотором расстоянии от нее кластером движущихся клеток - мобильной части сосудистой почки. Последняя включает в себя кооперативно взаимодействующие три типа клеток: миграционные эндотелиоциты, макрофаги различной степени дифференцированности (моноцитоподобные клетки, мононуклеарные макрофаги и полинуклеарные фагоциты) и средние лимфоциты. Клетки движущегося кластера контактируют друг с другом при помощи многочисленных, переплетающихся цитоплазматических отростков.

Активное поступательное движение мобильной части сосудистой почки обеспечивают, главным образом, средние лимфоциты, способные, как известно, к перемещениям с большой скоростью [5]. Миграционные эндотелиоциты и макрофаги перемещаются более медленно по амебоидному типу. Миграционные эндотелиоциты и макрофаги, связанные цитоплазматическими отростками с эндотелиоцитами капиллярной почки, обеспечивают натяжение ее эндотелиального пласта и удлинение, ориентированное в направлении перемещения мобильной части сосудистой почки.

Макрофаги подвижных кластеров функционально активны и содержат вакуоли, многочисленные фагосомы и светлые округлые гранулы 0,2 - 0,3 мкм в диаметре, содержащие вещество средней электронной плотности, ультраструктурно сходное с липидными включениями. В средних лимфоцитах ядра находятся в состоянии гиперфункции, имеют изрезанные контуры и небольшие сегменты, располагающиеся в хвостовой части цитоплазмы, содержащей много-

численные митохондрии и свободные рибосомы, что свидетельствует о значительных биоэнергетических возможностях клеток. Наименее дифференцированы в сосудистой почке миграционные эндотелиоциты. Они имеют конусовидную форму, вершиной ориентированы в направлении движения и содержат крупное ядро с хорошо выраженным ядрышком и небольшим объемом цитоплазмы, охватывающим ядро узким ободком. Такая ультраструктурная организация характерна для клеток с ядерным типом биосинтетических процессов.



а



б

Рис. 4. Ультраструктурная организация сосудистых почек через 3 (а) и 5 (б) суток после перелома. В вершинах сосудистых почек располагаются эндотелиоциты с экспрессией миграционного фенотипа, образующие цитоплазматические отростки — цитоподии (тонкие стрелки). Мобильный кластер клеток (МКК) сосудистой почки состоит из макрофага (МФ), среднего лимфоцита (СЛ) и миграционного эндотелиоцита (МЭ). Просвет в новообразованных участках капиллярных терминалей образуется за счет цитоплазматических отростков (тонкие стрелки) и слияния внутриклеточных вакуолей (толстая стрелка). Электронограмма. Увеличение 7000

Известно, что образование просветов новообразованных капиллярных терминалей в эмбриогенезе осуществляется двумя возможными путями: внутриклеточно и с участием внеклеточных механизмов [2]. При первом способе просвет сосудов формируется за счет секреторной активности ангиобластов, образования цепочек из внутриклеточных вакуолей и их последующего слияния. При втором способе эндотелиоциты капилляров при помощи цитоплазматических отростков и межклеточных соедине-

ний между ними окружают часть межклеточного пространства, из которого и формируется в дальнейшем просвет сосуда.

По нашим данным, канализация капиллярных терминалей, образующихся при заживлении перелома, происходит по тем же законам, что и в эмбриогенезе с преобладанием первого или второго путей в зависимости от плотности окружающего матрикса. Капиллярные терминали, растущие в рыхлую "воспалительную" интерстициальную ткань с большим содержанием экссудата, канализируются за счет образования длинных, ветвящихся цитоплазматических выростов эндотелиоцитов, ориентированных вдоль поверхности капилляра и охватывающих участки периваскулярного пространства, часто вместе с клеточным детритом и экссудатом плазмы (рис. 4а). Одновременно наблюдается и образование внутриэндотелиальных цепочек вакуолей, а также изолированных вакуолей и последующее их слияние с формированием просвета в новообразованном сосудистом участке. Вторым способом образования просветов в сосудах преобладает в капиллярных терминалях, растущих в более плотный матрикс периваскулярных пространств (рис. 4б).

Таким образом, выполненное нами ультраструктурное исследование ранних этапов заживления переломов в условиях остеосинтеза аппаратом Илизарова позволило выявить ряд неизвестных ранее особенностей ангиогенеза в формирующихся регенератах.

Впервые показано стимулирующее влияние форменных элементов крови, главным образом, средних лимфоцитов на рост сосудистых почек, ориентированный в направлении ангиогенного стимула.

Впервые выявлена и описана мобильная часть сосудистой почки. Установлено, что она образована кластером кооперативно взаимодействующих клеток: макрофагов, средних лимфоцитов и миграционных эндотелиоцитов, осуществляющих совместное движение по направлению градиента концентраций стимуляторов ангиогенеза.

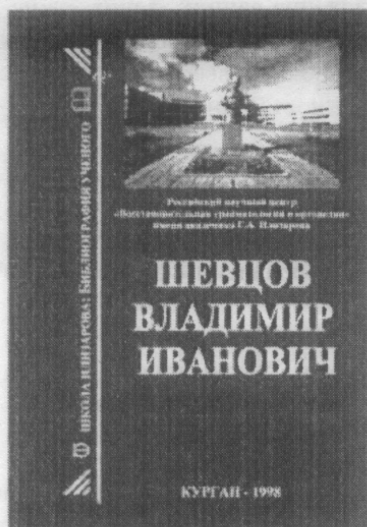
Установлено, что в процессе дифференцировки остеогенные клетки приобретают свойства продуцентов стимуляторов ангиогенеза. За счет направленного роста сосудистых почек к формирующимся костным трабекулам, дифференцирующиеся остеогенные клетки обеспечивают себе оптимальные условия микроокружения и оксидотический характер метаболизма. Таким образом, регенерирующая костная ткань и окружающие ее кровеносные сосуды образуют тканевой комплекс, обладающий свойствами самоорганизующейся и саморегулирующейся системы, функционирующей по принципу обратной связи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахо А. Электронномикроскопическое и гистологическое изучение заживления переломов кости у молодых и старых крыс. Механизмы регенерации костной ткани. - М.: Медицина, 1972. - С.52-85.
2. Куприянов В.В. и др. Ангиогенез: образование, рост и развитие кровеносных сосудов / В.В. Куприянов, В.А. Миронов, А.А. Миронов, О.Ю. Гурина. - М.: Квартет, - 1993. - 170 с.
3. Чернух А.М. Воспаление. - М.: Медицина, 1979. - 448 с.
4. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. - М.: Медицина, 1981. - 312 с.
5. Хэм А., Кормак Д. Гистология. В 5 т. - М.: Мир, 1983. - Т.2. - 254 с.
6. Ирьянов Ю.М., Мигалкин Н.С., Князева Л.М. Ультраструктурные особенности миоцитов бедренной артерии при удлинении голени в эксперименте // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1984. - Т.87, вып. 11. - С. 48-52.
7. Ультраструктурные особенности эластогенеза в магистральных артериях тазовой конечности собаки при удлинении голени / Г.А. Илизаров, Ю.М. Ирьянов, Н.С. Мигалкин, Н.В. Петровская // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1987. - Т.93, вып. 9. - С. 94-98.
8. Гурина О.Ю., Караганов Я.Л. Строение новообразованных капилляров кролика // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1984. - Т.87, вып. 8. - С. 49-57.
9. Palade G. E. Blood capillaries of the heart and other organs // Circulation. - 1961. - Vol.24. - P. 368-388.

Рукопись поступила 07.09.99.

Вышли из печати



В.И. Шевцов

**Биобиблиографический указатель
(к 60-летию со дня рождения)
Курган, 1998. - 116 с.**

Биобиблиографический указатель трудов генерального директора РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова, заслуженного деятеля науки РФ, д.м.н., профессора Владимира Ивановича Шевцова включает краткий биографический очерк, перечень основных этапов научно-практической деятельности ученого и врача, библиографию его трудов с 1964 по 1998 гг. Хронологический порядок библиографических записей раскрывает творческий путь профессора В.И. Шевцова и отражает новые шаги в развитии метода чрескостного остеосинтеза в вертебрологии, ангиологии, онкологии и т.д., а также в области фундаментальных исследований.

Указатель имеет сквозную нумерацию. Именной указатель в конце книги познакомит читателя с соавторами ученого.

Серия указателей трудов "Школа Илизарова: библиография ученого" будет регулярно выходить к знаменательным датам и других учеников академика Г.А. Илизарова. Цель издания - познакомить травматологов, ортопедов, ангиологов, онкологов и врачей других областей медицины с наследием школы Илизарова. Указатель окажет помощь работникам медицинских и массовых библиотек в пропаганде метода чрескостного остеосинтеза по Илизарову и представит интерес для широкого круга читателей.