

**Экспериментальные аспекты изучения
хондрогенного потенциала мезенхимальных
плюрипотентных и малодифференцированных клеток,
"культивированных" *in vivo***

**Д.А. Маланин, В.Б. Писарев, В.Г. Шилов, Г.Л. Снигур, Л.Л. Черезов,
Р.А. Михайлов, И.В. Деревянко**

***Experimental aspects of studying of chondrogenic potential of
mesenchymal pluripotent and little-differentiated cells, "cultivated"
in vivo***

**D.A. Malanin, V.B. Pisarev, V.G. Shilov, G.L. Singour, L.L. Cherezov, R.A. Mikhailov,
I.V. Derevianko**

Волгоградская медицинская академия (ректор - академик РАМН, д. м. н., профессор В. И. Петров)

Представлены результаты изучения хондрогенного потенциала мезенхимальных плюрипотентных и малодифференцированных клеток, пересаженных в составе distractionного регенерата костной мозоли в область полнослойных дефектов суставного гиалинового хряща.

Ключевые слова: гиалиновый хрящ, замещение дефектов, регенерация, distraction, остеобласты, хондроциты.

The results of the study of the chondrogenic potential of mesenchymal pluripotent and low-differentiated cells, which were transplanted into the zone of full-layer defects of articular hyaline cartilage as a part of callus distraction regenerated bone are presented in the work.

Keywords: hyaline cartilage, defect filling, regeneration, distraction, osteoblasts, chondrocytes.

Приходится согласиться с тем, что разработанные к концу второго тысячелетия экспериментальные и клинические подходы к решению проблемы биологического восстановления поврежденных суставного гиалинового хряща (СГХ) еще далеки от совершенства. Известные способы пластики его полнослойных дефектов – «мезенхимальная стимуляция» (насверливание, абразия, микропереломы), пересадка хрящевых или костно-хрящевых ауто- или аллотрансплантатов большого и малого размеров, пересадка аутогенной надкостницы или надхрящницы в сочетании (или без) с хирургической коррекцией биомеханической оси конечности – используются в клинической практике с различной степенью эффективности [3, 9, 14, 17, 21, 25, 31, 46, 47, 50, 52, 58, 60, 69]. Ожидаемый результат применения этих способов – органотипичное замещение дефектов СГХ и восстановление полноценной функции сустава – характеризуется малой предсказуемостью [19, 25, 33, 39, 40, 41, 55]. Образующийся регенерат обычно представляет собой грубоволокнистую соединительную ткань, волокнистый хрящ или смешанный тип ткани – фибро- и гиалиноподобный хрящ [5, 14, 19, 21, 25, 33, 39, 54, 55, 63]. Биомеханиче-

ские свойства новообразованной ткани изучены недостаточно, но, очевидно, уступают таковым в нормальном СГХ. Отдельные исследовательские работы демонстрируют прогрессирующие дегенеративные изменения регенерата в отдаленные сроки после пластики [32, 53, 54, 63]. Нередко между морфологическим субстратом его и клиническим результатом не отмечается коррелятивных взаимоотношений [33, 37, 39, 55].

Стремление воссоздать не только первоначальную анатомическую форму, но и внутреннюю структуру поврежденной суставной поверхности в настоящее время связывают с развитием таких направлений в медицине, как тканевая инженерия, генная терапия и молекулярная биология, призванных обеспечить достаточную по объему популяцию клеток с хондрогенной экспрессией и матрикс для их развития [1, 49, 55, 61, 66, 67].

Целью настоящего исследования являлось изучение хондрогенного потенциала мезенхимальных плюрипотентных и малодифференцированных клеток, пересаженных в составе distractionного регенерата костной мозоли в область полнослойных дефектов СГХ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 12 беспородных собаках (23 коленных сустава) в возрасте от 2 до 5 лет, с массой от 5 до 15 кг.

Оперативные вмешательства выполняли под внутривенным тиопенталовым наркозом. На первом этапе восьми животным 1-й группы осуществляли поперечную остеотомию костей голени одной из задних конечностей (подбугорковую - большеберцовой кости, в нижней трети диафиза - малоберцовой кости) и фиксировали сегмент аппаратом Илизарова из двух опор. Дозированную distraction (по 2 мм в сутки в два приема) начинали через 3-4 дня после остеотомии и продолжали до 14-15-ти или 22-23-х дней. По окончании distraction в межмышечковой области бедренной кости 16-ти коленных суставов с помощью пробойника цилиндрической формы диаметром 5 мм создавали полнослойный дефект СГХ, проникающий через субхондральный слой кости. Из разреза мягких тканей голени противоположной конечности забирали участок distractionного регенерата (ДР). Последний помещали путем "плотной посадки" в дефект суставной поверхности таким образом, чтобы он выступал над окружающим хрящом на 2-3 мм. В области забора ДР создавали компрессию между отломками до сращения перелома. После восстановления функции обеих задних конечностей описанную выше

операцию из нескольких этапов проводили на костях другой голени и противоположном коленном суставе.

У 4-х животных 2-й группы (7 коленных суставов) создавали аналогичные дефекты суставной поверхности, но не заполняли их тканью ДР.

Динамику репаративного процесса в области восстановленных дефектов СГХ прослеживали при артротомиях через 2, 8, 16 и 24 недели после пластики. Интраоперационные биоптаты забирали в форме костно-хрящевых блоков, готовили по общепринятым гистологическим методам, окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и изучали микроскопически. По прошествии вышеуказанных временных интервалов визуально и микроскопически оценивали следующие параметры: клеточный состав ткани, степень заполнения дефекта, структуру поверхностных и глубоких слоев дефекта, окрашивание матрикса, сращение образующейся ткани с окружающим СГХ, восстановление субхондрального слоя кости. Количественные показатели подсчитывали с помощью стереометрического метода [1]. Кроме этого, морфологическому исследованию подвергали участки ДР, которые забирали в момент пересадки в область дефектов суставной поверхности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ДР, взятые в сроки до 14-15-ти дней с момента остеотомии, визуально представляли собой хорошо кровотокающие мягкотканые образования розового цвета эластической консистенции.

Микроскопически ткань ДР в эти сроки состояла из тонких пучков коллагеновых волокон и плотно лежащих друг к другу широких пучков, имеющих продольную ориентацию, многочисленных групп малодифференцированных фибробластоподобных клеток, большого количества сосудов капиллярного типа (рис. 1). Вокруг последних отмечалась выраженная пролиферация перicyтов. В промежутках между волокнистыми структурами присутствовали очаги свободно расположенных эритроцитов.

В отдельных препаратах наблюдался процесс остеогенеза, заключающийся в образовании скелетогенных элементов – остеобластов и костных трабекул, направленных вдоль основных пучков коллагеновых волокон.

Клеточную популяцию новообразованной ткани можно было условно разделить на два типа. Первый тип (до 20-30% всех клеток) составляли клетки овальной формы с гиперхромным ядром, которые находились в рых-

лой аморфной эозинофильной массе. Второй тип представляли клетки вытянутой формы (до 70-80%), имеющие менее интенсивно окрашенное ядро.

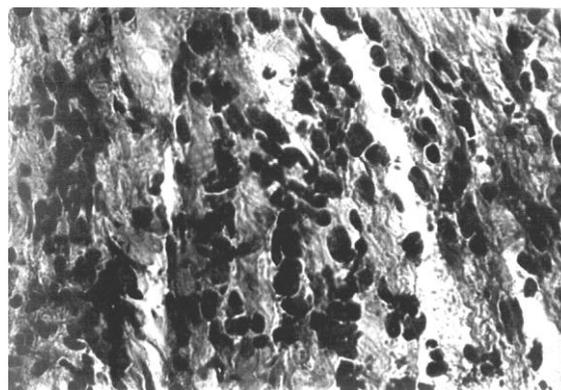


Рис. 1. Четырнадцатидневный ДР. Присутствуют малодифференцированные мезенхимальные клетки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 320$.

В более зрелых ДР (до 22-23 дней) признаки костеобразования носили отчетливый характер. Грубоволокнистая костная ткань встречалась очагами в виде первичных костных балок, ориентированных вдоль широких коллагеновых волокон и вертикальных сосудистых петель, и

клеток остеобластического ряда с большим ядром и светлой цитоплазмой (рис. 2). Менее зрелые формы остеобластов находились в эозинфильно окрашенном основном веществе, имеющем нитевидную волокнистую структуру. Изменения, произошедшие в морфологической структуре, предопределяли макроскопические различия между ДР 14-15-дневной и 22-23-дневной зрелости. При внешнем сходстве ткань последних казалась более плотной при остром отделении и менее эластичной при надавливании инструментом.

Через 2 недели область пластики дефекта ДР у животных 1-ой группы была заполнена тканью бледно-розового цвета, которая несколько выступала над уровнем окружающего нормального СГХ. Хорошего сращения между краями её и хряща не наблюдалось: пластический материал без усилий смещался инструментом. Такая попытка вызывала кровотечение из глубины костной раны.

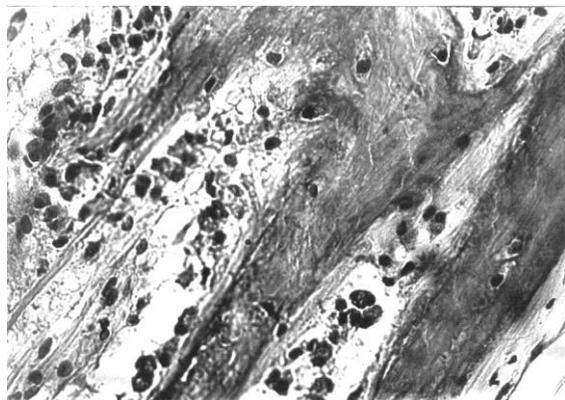


Рис. 2. Двадцатитрёхдневный ДР. Образование первичных костных балок. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 320$.

У животных 2-й группы в эти же сроки на суставной поверхности мышелков бедренной кости отмечался дефект СГХ правильной округлой формы, заполненный на 1/2 или 2/3 глубины мягкой тканью розового цвета и желеподобным фибриновым сгустком.

Микроскопическое исследование препаратов, взятых из области пластики, показало, что в трансплантатах пересаженных ДР происходят разной степени выраженности дегенеративные изменения. Они были более заметны в поверхностных слоях и заключались в некотором уменьшении количества малодифференцированных клеток, серозном отёке и разволокнении. Особенностью дегенерации в трансплантатах ДР 22-23-х дней являлся лизис костных трабекул и значительное уменьшение численности клеток остеобластического ряда. В подлежащий к субхондральной кости слой трансплантатов вращало множество сосудов синусоидного типа. С краями окружающего СГХ ткань пересаженных ДР соединялась посредством тонких

разнонаправленных волокон фибрина. Между ними встречались клетки форменных элементов крови, окружающие немногочисленные сосудистые петли, врастающие также из стромы костной ткани.

В препаратах из области сформированных дефектов СГХ у животных 2-й группы микроскопически определялось развитие незрелой грануляционной ткани, многочисленные сосуды которой вращали из подлежащей губчатой кости в расположенный на поверхности фибриновый сгусток.

По прошествии 8 недель после пластики дефектов визуально отмечалось их хорошее восстановление. Суставная поверхность выглядела ровной и гладкой, хотя зона пересаженного ДР все еще отличалась по цвету и консистенции от окружающего СГХ: она была белесоватая, а при надавливании инструментом - более эластичная, чем хрящ (рис. 3). Формирующийся регенерат по периферии хорошо срастался с СГХ таким образом, что создавалось впечатление о плавном переходе одной ткани в другую. У животных 2-й группы в аналогичные сроки определялся дефект СГХ, дно которого было покрыто тонким слоем ткани розового цвета, Хрящевые края дефекта несколько сгладились и хорошо срастались с новообразованной тканью. Однако регенерат не достигал своей поверхностью уровня окружающего СГХ, занимая приблизительно 1/3 его толщины.

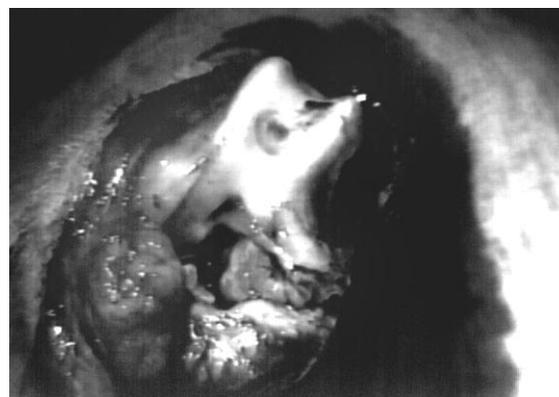


Рис. 3. Через восемь недель после пересадки 14-дневного ДР. Визуально отмечается хорошее восстановление дефекта новообразованной тканью.

Морфологическое изучение регенератов через 8 недель с момента пересадки показало, что у животных 1-й группы в препаратах присутствует смешанный тип ткани: среди элементов волокнистой соединительной ткани, содержащей фибробластоподобные клетки, встречались очаги гиалинового хряща с пролиферирующими хондроцитами (рис. 4).

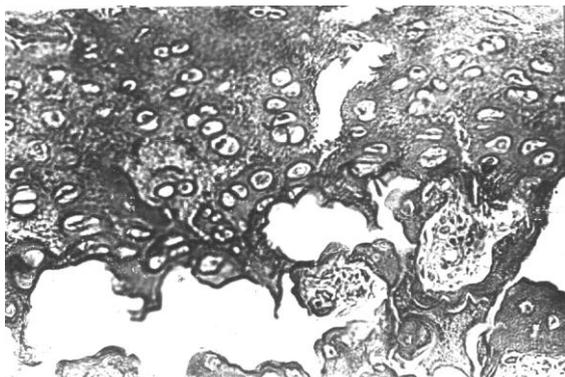


Рис. 4. Через восемь недель после пересадки 14-дневного ДР. Дефект заполняется элементами хрящевой ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 320.

Образование хряща наблюдалось как в поверхностных и средних слоях регенератов, так и на границе с субхондральной костью (рис. 5). Интенсивность хондрогенеза в препаратах после пластики ДР 22-23-х дней имела менее выраженный характер, а очаги гиалинового хряща располагались только на границе с костной тканью. В поверхностных и средних слоях происходило созревание фиброзной ткани: основным видом клеток являлись фибробласты, коллагеновые волокна уплотнились и приобретали параллельную суставной поверхности ориентацию. Количество сосудов значительно уменьшалось по сравнению с первоначальными наблюдениями, тогда как в базальных отделах ангиогенез продолжался. Новообразованная ткань хорошо интегрировала с краями окружающего СГХ на всю его толщину. Интересно было отметить, что в краевых отделах СГХ имело место значительное усиление пролиферативной и синтетической активности хондроцитов, которые формировали изогенные группы и продуцировали межклеточное вещество, выступающее за пределы ровных краев (рис. 6).

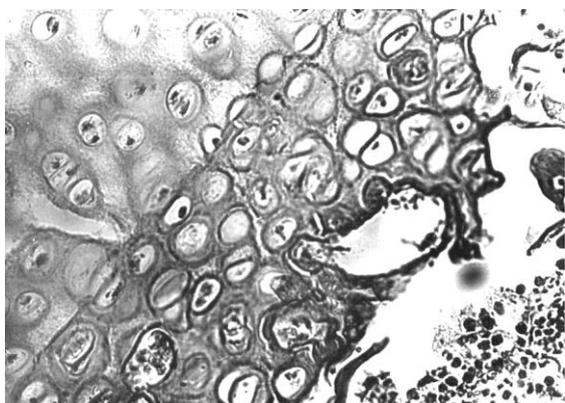


Рис. 5. Через восемь недель после пересадки 14-дневного ДР. Область дна дефекта. Пролiferация хрящевой ткани на границе с субхондральной костью. Окраска гематоксилином и эозином. У в. X 460.

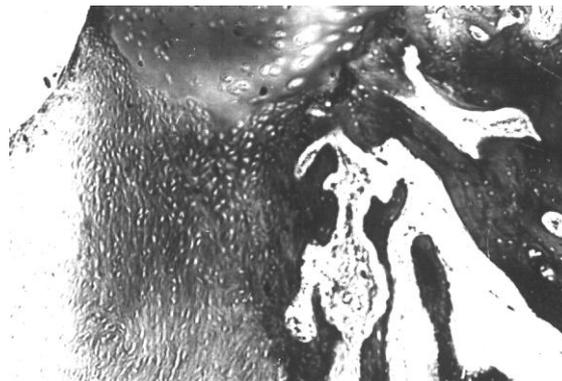


Рис. 6. Через двадцать четыре недели после пересадки 14-дневного ДР. Индукция хондрогенеза на границе с окружающим СГХ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х320.

Репаративный процесс затрагивал и подлежащую костную ткань, где происходило образование первичных костных пластинок и балок, хотя непрерывность субхондрального слоя в зоне дефекта еще не была восстановлена.

В препаратах из области дефектов суставной поверхности у животных 2-й группы наблюдалась волокнистая соединительная ткань. Сетчатая структура её межклеточного вещества не имела определенной организации. Коллагеновые волокна прорастали через края дефекта окружающего СГХ, обеспечивая сращение с новообразованной тканью. На границе с костью в отдельных препаратах обнаруживались скопления немногочисленных групп хондроцитов. Субхондральный слой восстановлен не был, но образование костной ткани происходило достаточно интенсивно в большинстве дефектов.

Спустя 16 недель, при артротомии у животных 1-й группы, область артропластики мышечков бедренной кости напоминала окружающий её СГХ. Граница перехода регенерата в хрящ оставалась различной, несмотря на плотное сращение между краями. При надавливании инструментом регенерат выглядел более плотным, чем по прошествии 8 недель. Напротив, у животных 2-й группы на суставной поверхности отмечалась дуфигурация за счет округлого углубления диаметром 5 мм со сглаженными краями. Дно углубления выстилала ткань белого цвета, которая микроскопически представляла собой грубоволокнистую соединительную ткань (рис. 7). Сетчатая структура её приобретала более упорядоченное строение - коллагеновые волокна поверхностного слоя ориентировались параллельно. Однако в некоторых препаратах имелись очаги разволокнения, а также зоны образования больших и малых полостей. Клеточную популяцию представляли фибробласты, количество наблюдаемых в глубоких слоях хондроцитов не превышало 5-6%.

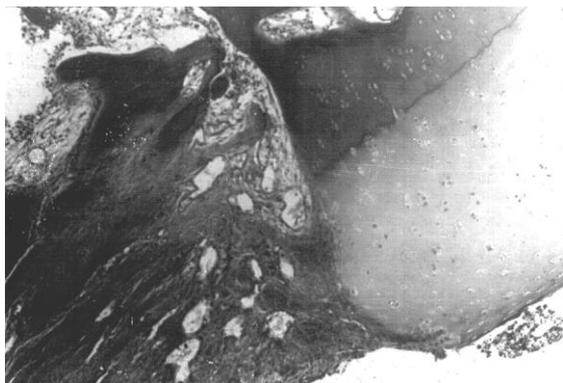


Рис. 7. Через двадцать четыре недели после создания дефекта. Спонтанное заживление грубоволокнистой соединительной тканью. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 320.

Морфологическое исследование регенерата из области пластики у животных 1-й группы через 16 недель свидетельствовало об образовании гиалиноподобного хряща. Он отличался от нормального СГХ значительной клеточной насыщенностью и отсутствием чёткой зональной организации. В отдельных препаратах регенерат был представлен смешанным типом ткани - фиброхрящом с очагами гиалиновой хрящевой

ткани или только волокнистым видом хряща. Большинство из этих наблюдений относились к пластике дефектов 22-23-дневными ДР. Новообразованный хрящ хорошо срастался по краям с окружающим нормальным СГХ.

Через 24 недели суставная поверхность области пластики выглядела ровной и гладкой, однако её все еще можно было различить на фоне окружающего СГХ. Последний, как и противоположащий к дефекту хрящ надколенника, не имел визуальных признаков дегенерации.

В коленных суставах животных 2-й группы форма суставной поверхности оставалась измененной, а на соответствующем СГХ надколенника у нескольких собак наблюдалось поверхностное разволокнение.

Морфологическая картина в указанные сроки характеризовалась незначительной динамикой в направлении упорядочения структуры и ориентации регенераторных элементов в обеих группах животных. Субхондральный слой был восстановлен менее чем на 50%. При этом процесс структурной перестройки более активно протекал в дефектах с восстановленным под регенератом слоем кости, чем в зонах, где она отсутствовала.

ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство исследователей указывают на необходимость соблюдения ряда условий для достижения органотипичного заживления СГХ даже при его незначительных повреждениях. К ним относят плотный контакт и обездвиженность краев хрящевой раны, наличие популяции клеток, способных дифференцироваться в хондроциты, и матрикса для их развития, воздействие механических стимулов на воссозданную анатомически правильную форму суставной поверхности, купирование асептического посттравматического воспаления в суставе, нормализацию синовиальной среды и защиту восстановленного хряща от избыточной нагрузки [5, 18, 19, 33, 55, 59, 65].

Несоблюдение этих условий или малейшее отклонение от них исключает формирование регенерата, характерного для СГХ даже при его незначительных повреждениях [19]. Поэтому спонтанный репаративный процесс во многих случаях завершается замещением дефектов суставной поверхности другим видом ткани (волокнистая соединительная ткань, фиброхрящ, смешанный вид ткани). Еще более высокие требования предъявляются к обеспечению заживления средних и больших по размеру дефектов (более 2 см), и особенно тех, которые не проникают через субхондральный слой кости. Среди них на первом месте стоит создание достаточной по численности популяции пролиферирующих клеток с хондрогенной экспрессией, способных синтезировать необходимое количество

коллагена Ц типа и протеогликанов [19, 33, 40, 55, 59, 68].

Возможности хондроцитов поврежденного хряща участвовать в восстановительном процессе крайне ограничены и складываются из кратковременного всплеска пролиферативной и синтетической активности групп клеток, расположенных по краям дефекта [39, 33, 55, 59].

Известны несколько источников получения клеточного материала для оптимизации течения репаративного хондрогенеза. Т.П. Виноградова [6], развивая учение А.А. Максимова [20], А.В. Русакова [23] о соединительной ткани и репаративном потенциале мезенхимального резерва клеток у позвоночных, убедительно показала, что убыль хряща может восполняться путём развития хрящевой ткани из окружающих соединительно-тканых недифференцированных элементов. Реализующие этот принцип способы так называемой "мезенхимальной стимуляции" - абразия, насверливание, микропереломы - включаются в репаративный процесс малодифференцированные клетки эндоста губчатой кости, костного мозга и приводят к замещению дефектов волокнистой хрящевой тканью [9, 25, 47, 50, 54, 60]. Дополнительное использование пластики аутогенной надкостницей или реберной надхрящницей, сохраняющих в определенной степени способность к хондрогенной дифференцировке на протяжении всей жизни животных и человека, не приближает в полной мере морфологические характеристики новообразованной ткани к ис-

тинному СГХ [3, 21, 46, 52, 58, 62, 63]. Нельзя не отметить и значительное уменьшение с возрастом хондрогенного потенциала малодифференцированных камбиальных клеток надкостницы и надхрящницы [33, 38, 55, 58].

Пересадка клеточного материала в составе зрелого хряща, в том числе СГХ, не позволяет рассчитывать на такой уровень его пролиферативной и синтетической активности, который бы способствовал формированию дополнительного объема хрящевой ткани. Заместительная функция аутогенных костно-хрящевых трансплантатов наиболее совершенна за счет установленного выживания хондроцитов и приближения репаративного хондрогенеза к физиологическому, но ограничена размерами донорских областей и, соответственно, воспроизведением точной формы суставной поверхности в зоне повреждения [5, 19, 31, 39, 59]. Последнее требование вполне достижимо при применении аллотрансплантатов хряща. Двухэтапно замороженный или свежий аллохрящ содержит после пересадки жизнеспособные хондроциты, обладающие пониженной синтетической активностью [19, 33, 41, 55, 69]. Надежды на выживание их и постепенное замещение аналогичными клетками реципиента, имеющими мезенхимальное происхождение, нередко не оправдываются, и возникающий регенерат содержит в себе участки аллохряща, волокнистый и гиалиноподобный хрящ, волокнистую соединительную ткань [6, 9, 14, 17, 25]. Весьма вероятно, что степень участия выживающих хондроцитов аллоткани в репаративном хондрогенезе, согласно существующей концепции о неоспоримых преимуществах пересадки "живой ткани", несколько преувеличена. К тому же клетки последней могут содержать источник инфекционных и вирусных заболеваний, например ВИЧ [33, 34, 55].

Наличие рассмотренных выше недостатков известных способов восстановления дефектов СГХ как с биологической, так и с клинической точек зрения явилось одним из факторов развития нового направления в хондропластике – пересадки культивированных клеток.

Впервые клетки-хондроциты были выделены из СГХ и трансплантированы в дефект головки плечевой кости кроликов А.У. Smith [44, 64] в 1965 году.

В настоящее время для получения культуры клеток с хондрогенной экспрессией в эксперименте и клинике проводятся работы по использованию аллогенных или аутогенных хондроцитов, выделенных из СГХ, хряща эпифизарной зоны роста, костной мозоли, костного мозга, надкостницы, эмбриональной ткани [33, 35, 40, 44, 48, 49, 55, 59, 61, 65, 68]. На период времени до 1997 года, согласно сведениям International Cartilage Repair Society, во всем мире была уже выполнена 891 трансплантация хондроцитов

410 хирургами [43]. Данные современных исследований позволяют предположить, что создание необходимой для заживления дефекта культуры клеток с высокой пролиферативной и синтетической активностью возможно путём внесения изменений в геном уже дифференцированных или использования плюрипотентных клеток, начальные формы направленного развития которых обладают такой способностью [36, 51, 59, 66]. В представленной работе мы предприняли попытку изучить хондрогенный потенциал мезенхимальных клеток, помещенных в синовиальную среду функционирующего сустава и соответствующее окружение. Для получения популяции плюрипотентных клеток была использована модель distractionного остеосинтеза перелома. Способность остеогенных клеток образовывать под влиянием растягивающих нагрузок волокнистую или хрящевую ткань была отмечена S. Krompecher [51]. Г.А. Илизаровым и его школой проведены глубокие исследования механизмов остеогенной дифференцировки этих клеток [8, 11, 15, 16].

Согласно концепции Илизарова Г.А. [8, 15, 16], малодифференцированные клетки distractionного регенерата могут иметь несколько источников происхождения. Один из них – эндост противостоящих костных отломков, второй – костный мозг отломков, а третий связан с существующей в организме популяцией свободно циркулирующих остеогенных клеток-предшественников, способных к миграции из костного мозга интактных костей в зону формирования регенерата. Участие в репаративном процессе надкостницы и околокостных мягких тканей - незначительно [12]. Д.С. Саркисов и др. [30] выявили при distractionном остеосинтезе переломов преобразование околососудистых клеток эндотелиоцитов и перицитов, обладающих высокой пролиферативной активностью, в фибробластоподобные клетки, которые, как известно, способны дифференцироваться как в направлении остеобластов, так и хондробластов (хондроцитов). С другой стороны, малодифференцированные фибробластоподобные клетки "зоны роста" distractionного регенерата могут быть источником не только костной (или хрящевой) ткани, но и эндотелиоцитов кровеносных сосудов, что не только поддерживает теорию Г.А. Илизарова [10, 16] о единстве клеточных источников новообразования костной и кроветворной тканей, но и свидетельствует в пользу сохраняющейся в онтогенезе общей плюрипотентной стволовой клетки [22, 42].

Течение репаративного процесса в ДР определяется в некоторой степени режимом distraction, который изменяет местные условия кровоснабжения и влияет таким образом на направленность дифференцировки скелетогенных клеточных элементов или формирует метаболиче-

ский профиль будущего ДР [24, 27]. В нашей работе темп дистракции достигал 2 мм в сутки в два приема, что, как установлено [24], замедляет процесс остеогенеза вследствие большого по величине и травматичного разового перемещения отломков. Нарушение оксидотического характера метаболизма приводит к образованию в зоне диастаза ткани с преимущественно анаэробным типом обмена [12, 19, 29]. Морфологическая картина препаратов ДР 14-15-дневной зрелости показала преобладание фибробластоподобных клеток, находящихся среди пучков коллагеновых волокон, что ранее наблюдали в своих исследованиях и другие авторы [24, 29]. Несмотря на сохраняющийся прежний темп дистракции, в биоптатах из более зрелых ДР (22-23 дня) процессы образования костной ткани были выражены уже в значительной степени. Объяснение этому наблюдению, по всей видимости, не связано с предположением некоторых авторов [4, 19] об отсутствии различий в характере репаративного процесса, развивающегося под влиянием повторной травматизации, в зависимости от скорости и дробности дистракции, а находится в плоскости технического обеспечения операции.

Малодифференцированные клетки регенерата помещались в область дефектов СГХ в составе матрикса, значение которого для репаративного хондрогенеза также велико. Основой матрикса регенерата является коллагеновая структура, представленная коллагеном III и I типов [36, 57]. Коллагеновые волокна способны защищать клетки в условиях динамических компрессионных нагрузок в суставе. Определяющее воздействие их на направленность регенерации и трофику СГХ уже не вызывает сомнений [5, 9, 19, 25, 39, 56, 65]. Поэтому активные движения в коленных суставах у собак после операции не ограничивались. Хондрогенной дифференцировке клеток регенерата способствует и содержание в межклеточном веществе большого количества гликозаминогликанов [13, 36]. Источником гликопротеинов в регенерате, по мнению В.И. Шевцова и др. [26], могут быть разрушенные костные клетки, хотя нельзя исключить биосинтетическую активность фибробластоподобных клеток, субпопуляции которых увеличиваются в первые недели дистракции [2], а также поступление гликопротеинов из крови. Матрикс ДР, благодаря наличию очагов воспаления, является субстанцией, где аккумулируются и синтезируются мощные модуляторы, хемоаттрактанты, индукторы и стимуляторы, среди которых трансформирующий фактор роста β , фактор роста фибробластов, инсулиноподобный фактор роста, обладающие несомненным воздействием на хондрогенез [26, 45]. С достаточной долей уверенности можно предположить участие этих соединений в репаративном процессе после пересадки ДР в дефект

СГХ. Наличие факторов роста объясняет и выраженное индуцирующее влияние на пролиферацию и синтетическую активность хондроцитов нормального СГХ по краям дефекта у животных 1-й группы. В свою очередь, существующая обратная индукция, обусловленная нахождением в синовиальной среде сустава, способствует направленному развитию трансплантата [6, 9, 19, 25, 32, 59].

Помещенный в дефект СГХ и кости ДР в ранние сроки подвергался в большей или меньшей степени дистрофическим изменениям, включающим гибель части клеток. Влияние микронокроза клеточных элементов регенерата, согласно исследованиям В.И. Шевцова, А.В. Попкова [28], заключается в стимуляции пролиферативных процессов, в том числе в окружающих тканях. Клеточная популяция вновь увеличивалась к 8 неделям после пластики, что происходило, вероятно, не только вследствие пролиферации клеток трансплантата, но и в связи с поступлением малодифференцированных клеток из подлежащей костной ткани, костного мозга и прилежащей синовиальной мембраны. Процесс этот в глубоких слоях трансплантата сопровождался инвазией новообразованных сосудов, вокруг которых - периваскулярно - располагались малодифференцированные клетки. Более выраженные дистрофические изменения мы наблюдали после пересадки участков зрелых 22-23-дневных регенератов, уже имеющих остеогенную направленность в своем развитии, а следовательно, высокую чувствительность к недостатку кислорода. Несмотря на исчезновение первичных костных элементов в трансплантатах, этот процесс нельзя было отнести к обратному развитию, а результатом пластики дефекта СГХ более зрелым ДР являлось образование фиброхрящевой или фиброзной ткани. Напротив, через 16-24 недели после пересадки менее зрелых регенератов наблюдалось замещение дефектов гиалиноподобной хрящевой тканью. Морфологическая структура её отличалась от таковой в контрольной группе животных, где дефекты в указанные сроки были заполнены волокнистой соединительной тканью или волокнистым хрящом.

Отличие гиалиноподобного от нормального СГХ заключалось в гиперклеточности и отсутствии типичной зональной организации новообразованной ткани. S. Takahashi и др. [36] в своей работе по пересадке костной мозоли в дефект СГХ подчеркнули другую черту гиалиноподобного хряща - неполноценное формирование поверхностного тангенциального слоя, которое подтвердилось и в нашем исследовании. Важная роль этого слоя в предотвращении дегенеративных изменений регенерата рассматривается в отдельных исследовательских работах на одном уровне по значимости с восстановлением суб-

хондрального слоя кости и сращением с окружающим СГХ [54, 63]. В этой связи хотелось бы отметить важность сохранения субхондральной кости для более равномерного распределения динамической компрессионной нагрузки на трансплантат. В нашем исследовании для прочной фиксации ДР непрерывность костной ткани нарушалась, что могло быть причиной как замедления репаративного хондрогенеза, так и последующей дегенерации новообразованной хрящевой ткани, особенно при больших по размерам дефектах суставной поверхности. Однако детальное изучение процесса развития дегенеративных изменений в новообразованной ткани не

входило в задачи нашего исследования. Максимальная продолжительность наблюдения за заживлением дефектов после пластики (24 недели) была выбрана исходя из известных данных экспериментальных работ о завершении, в целом, репаративного хондрогенеза спустя 3-4 месяца с момента операции [19, 36, 56, 59, 62, 63, 68].

Представленный в работе способ пластики дефектов СГХ по вполне понятным соображениям мы не рассматриваем с точки зрения возможного клинического применения, но надеемся, что экспериментальная модель окажется полезной для развития современных направлений в хондропластике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного экспериментального исследования подтверждают концепцию о плюрипотентности мезенхимального ростка клеток и, в частности, малодифференцированных клеток незрелого ДР костной мозоли. Под влиянием биологических и механических факторов внешнего окружения ДР, помещенный в дефект СГХ, способен трансформироваться в

гиалиноподобную хрящевую ткань. Мезенхимальные клетки могут рассматриваться как потенциальный источник для получения культуры клеток с хондрогенной экспрессией, а экспериментальная модель пластики дефектов СГХ - как представляющая определенный интерес для развития тканевой инженерии в хондропластике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. и др. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблунчанский, В.Г. Губенко. - М.: Медицина, 1981. - 192с.
2. Леонова С.Н. Механизм морфогенеза соединительнотканых структур конечности в условиях дозированного растяжения // Гений ортопедии. - 1996. - №2-3. - С. 124.
3. Беллендир Э.Н. Теоретическое обоснование и применение пластических операций при костно-суставном туберкулезе // Травматол. ортопед. России. - 1995. - №6. - С. 7-13.
4. Биологические аспекты удлинения конечностей / В. И. Стецула, Г.И. Лаврищева, В.П. Штин и др. // Ортопед., травматол. - 1984. - № 9. - С. 21-26.
5. Виноградова Т.П. Биологические особенности хрящевой ткани и их значение в клинической ортопедии и травматологии: Актовая речь. - М.: ЦИТО, 1964. - 16с.
6. Виноградова Т.П. Судьба пересаженного хряща у человека (на материале ауто- и гомопластики): Дис... д-ра мед. наук. - М., 1946. - 140с.
7. Волков М.В., Оганесян О.В. Восстановление формы и функции суставов и костей. - М.: Медицина. - 256с.
8. Десятниченко К.С., Балдин Ю.П. Экспериментально-теоретические исследования, подтверждающие концепцию Г.А. Илизарова о единстве генеза костной и кроветворной тканей // Гений ортопедии. - 1995. - № 1. - С. 32-38.
9. Ежов Ю.И. Реконструктивно-восстановительные операции при дегенеративно-дистрофических заболеваниях тазобедренного сустава: Автореф. дис... д-ра мед. наук. - Горький, 1989. - 30с.
10. Илизаров Г.А., Палиенко Л.А., Шрейнер А.А. Кроветворная функция костного мозга и её связь с активностью остеогенеза при репаративной регенерации в условиях удлинения конечности // Онтогенез. - 1984. - Т. 15, №2. - С. 617-623.
11. Илизаров Г.А., Хелимский А.М. Особенности репаративной регенерации при чрескостном компрессионно-дистракционном остеосинтезе // Современные проблемы регенерации. - Йошкар-Ола, 1980. - С. 28-55.
12. Илизаров Г.А., Штин В.П., Ледяев В.И. Репаративная регенерация компактной кости отломков диафиза при различных условиях дистракционного остеосинтеза // Второй съезд травматологов-ортопедов СССР: Материалы съезда. - М., 1969. - С. 89-91.
13. Имерлишвили И.А., Бахлыков Ю.Н., Дьячкова Г.В. Морфо-гистохимическая характеристика ранних стадий дистракционного регенерата // Чрескостный компрессионный и дистракционный остеосинтез в ортопедии и травматологии: Сб. науч. тр. - Курган, 1980. - Вып. 6. - С. 90-96.
14. Имамалиев А. С., Варсобиин В.И., Тимашкевич К. Д. Костно-хрящевые гомотрансплантаты при артропластике коленного сустава // Ортопед., травматол. - 1973. - № 5. - С. 74-77.
15. Ирьянов Ю.М. Морфологические исследования костных регенератов, формирующихся в условиях дистракционного остеосинтеза // Гений ортопедии. - 1998. - № 2. - С. 5-10.
16. К вопросу об участии стромальных клеток-предшественников костного мозга в регенерации кости при чрескостном остеосинтезе / Г.А. Илизаров, Л.А. Палиенко, П.Ф. Пересльцких и др. // Бюлл. эксперим. биол. - 1984. - № 4. - С. 489-490.
17. Коваленко Д.Г., Ерков В.П., Маракуша И.Г. О гомопластическом восстановлении суставов при туберкулезе и его последствиях // Ортопед., травматол. - 1972. - № 7. - С. 22-26.
18. Лаврищева Г.И. Об условиях регенерации хряща // Регенерация и клеточное деление. - М.: Медицина, 1968. - С. 222-227.
19. Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. - М.: Медицина, 1996. - С. 144-146.
20. Максимов А.А. (Maxsimov A.) Morphologie of mesenchymal reactios // Arch. Patol. lab. Medicine. - 1927. - BA 4. - №8. - P. 557-606.
21. Маленков И.Ю. Экспериментально-теоретическое обоснование перихондропластики в костно-суставной хирургии // Травматол. ортопед. России. - 1995. - № 6. - С. 58-61.
22. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в онтогенезе. - Киев: Наукова думка, 1984. - 192с.
23. Русаков А.В. К физиологии и патологии тканей внутренней среды. - М.: Медгиз, 1954. - 131с.
24. Теоретические аспекты дистракционного остеосинтеза. Значение режима дистракции /А.А. Шрейнер, С.А. Ерофеев, М.М. Щудло и др. // Гений ортопедии. - 1992. - № 2. - С. 13-17.
25. Троценко В. В. Мобилизирующие операции на коленном суставе у больных ревматоидным артритом: Дис... д-ра мед. наук. - М., 1993. - 352с.

26. Шевцов В.И., Ирьянов Ю.М., Дьячков А.Н. Морфофункциональная характеристика геморрагии при заживлении костных ран в условиях чрескостного остеосинтеза и в дистракционных регенератах // Гений ортопедии. - 1999. - № 4. - С. 5-12.
27. Шевцов В.И., Попков А.В. Оперативное удлинение нижних конечностей. - М.: Медицина, 1998. - 192с.
28. Шевцов В.И., Попков А.В. Стимуляция перестройки дистракционного регенерата // Анналы травматол. ортопед. - 1995. - № 2. - С. 23-26.
29. Штин В.П. Особенности костеобразования в зоне диастаза большеберцовой кости при удлинении голени аппаратом Илизарова (экспериментально-морфологическое исследование): Автореф. дис... д-ра мед. наук. - Новосибирск, 1979. - 41 с.
30. Электронно-радиоавтографическое исследование костеобразования при дистракционном остеосинтезе / Д.С. Саркисов, Б.М. Кюстюченко, Ю.А. Ампрасланов и др. // Бюлл. эксперим. биол. - 1984. - № 7. - С. 97-99.
31. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condilar articular defects / L. Hangody, G. Kish, Z. Karpati et al. // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. - 1997. - Vol. 5, N4. - P. 262-267.
32. Arthroscopic debridement of the arthritic knee / M.R. Baumgaertner, W.D. Cannon, J.M. Vittori et al. // Clin. Orthop. - 1990. - No 253. - P. 197-202.
33. Articular cartilage lesions of the knee / B.R. Mandelbaum, J.E. Browne, F. Fu et al. // Am. J. Sports Med. - 1998. - Vol.26, № 6. - P. 853-861.
34. Asselmeier M.A., Caspar! R.B., Bottenfield S. A. review of allograft processing and sterilization techniques and their role in transmission of the human immunodeficiency virus // Am. J. Sports Med. - 1993. - Vol. 21, No2. - P. 170-175.
35. Aston J. E., Bentley G. Repair of articular surfaces by allografts of articular and growth-plate cartilage // J. Bone Joint Surg. - 1986. - Vol 68-A, No1. - P. 29-35.
36. Autogenous callo-osseous grafts for the repair of osteochondral defects / S. Takahashi, M. Oka, Y. Kotoura, T. Yamamuro // J. Bone Joint Surg. - 1995. - Vol.77-B, No 2. - P. 194-204.
37. Bert J.M. Role of abrasion arthroplasty and debridement in the management of osteoarthritis of the knee // Rheum. Dis. Clin. North. Am. - 1993. - Vol.19, No 3. - P. 725-739.
38. Biological resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogene periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model / H.J. Kreder, M. Moran, F.W. Keeley, R.B. Salter // Clin. Orthop. - 1994. - No 300. - P. 288-296.
39. Buckwalter J.A. Articular cartilage. Part II. Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation // J. Bone Joint Surg. - 1997. - Vol. 79-A. - P. 612-631.
40. Buckwalter J.A., Mow V.C., Ratcliffe A. Restoration of injured or degenerated articular cartilage // J. Am. Acad. Orthop. Surg. - 1994. - Vol. 2, No.4. - P. 192-201.
41. Buliek D.D., Kelly M. Osteochondral and chondral fractures of the knee. In: Siliski J.M. (Ed.) Traumatic disorders of the knee. - New York: Springer-Verlag, 1994.-P. 37-37.
42. Buring K. On the origin of cells in heterotopic bone formation // Clin. Orthop. -1975. - N 110. - P. 293- 301.
43. Cartilage repair registry periodic report // Registry Report. - Vol. 4. - Cambridge, M.A., Genzyme Tissue Repair, february 1998.
44. Chesterman P.J., Smith A.U. Homotrasplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits // J. Bone Joint Surg. (Am.) . - 1968. - .No 50. - P. 184-197.
45. Comell C.N, Lane J.M. Newest factors in fracture healing // Clin. Orthop. - 1992. -№277.-P. 297-311.
46. Engkvist O., Johansson S.H. Perichondrial arthroplasty. A clinical study in twenty-six patients // Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. - 1980. - Vol. 14, No1. - P. 71-87.
47. Improvement of full-thickhess chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continious passive motion / J.J. Rodrigo, J.R. Steadman, J.F. Siliman // Am. J. Knee Surg. - 1994. - Vol. 7. - P. 109-116.
48. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum / H. Nakahara, S.P. Bruder, V.M. Goldberg, A.I. Caplan // Clin. Orthop. - 1990. - No 259. - P. 223-232.
49. Itay S., Abramovici A., Nevo Z. Use of cultered embrional chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage // Clin. Orthop. - 1987. - No 220. - P. 284-303.
50. Johnson L.L. The sclerotic lesion: pathology and the response to arthroscopic abrasion arthroplasty. In: Ewing J.W. (Ed.) Articular cartilage and knee joint function. - New York: Paven Press, 1990 - P. 319-333.
51. Krompecher S. Die Knochenbildung. - Jena, 1937. - 217 S.
52. Lorentzon R., Alfredson H., Hildingsson C. Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantations // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. - 1998. - Vol.64, N° 3. - P. 202-208.
53. Mankin H.J. The responce of articular cartilage to mechanical injury // J. Bone Joint Surg. (Am.) . - 1982. - Xo 64. - P. 460-466.
54. Mitchell N., Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone // J. Bone Joint Surg. (Am.) .-1976. -Vol.58, No 2. - P. 230-233.
55. Newman A.R. Articular cartilage repair. Current concept // Am. J. Sports Med. -1998. -Vol.2. - P. 309-324.
56. O'Driscoll S.W., Keeley F.W., Salter R.B. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year // J. Bone Joint Surg. - 1988. - Vol. 70, N4. - P. 595-606.
57. Page M., Hogg J., Ashhurst D.E. The effects of mechanical stability on the macromolecules of the connective tissue matrices produced during fractures healing. I. The collagens // Histochem. J. - 1986. - Vol. 18, N5. - P. 251-265.
58. Perichondrial graft for cartilage lesion of the knee / G.N. Homminga, S.K. Bupstra, P.S. Bouwmeester, A.J. van der Linden // J. Bone Joint Surg. - 1990. - Vol.72-B, No 6. - P. 1003-1007.
59. Principles of cartilage repair and regeneration / A. Caplan, M. Elyaderani, Y. Mochizuki et al. // Clin. Orthop. - 1997. - N 342. - P. 254-269.
60. Rae P.L., Noble J. Arthroscopic drilling of osteochondral lesion of the knee // J. Bone Joint Surg. - 1989. - Vol.71-B. - P. 534-542.
61. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel / S. Wakitani, T. Kimura, A. Hirooka et al. // J. Bone Joint Surg. - 1985. - Vol. 71-B. - P. 74-80.
62. Rib perichondrial autografts in full-thickness articular cartilage defects in rabbits / R.D. Coutts, S.L. Woo, D. Amiel et al. // Clin. Orthop. - 1992. - No 275. - P. 263-273.
63. Shapiro F., Koide S., Glimcher M.J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage // J. Bone Joint Surg. - 1993. - Vol.75- B, N 4. - P. 532-553.
64. Smith A.U. Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals // Nature. - 1965. - Vol. 205. - P. 782-789.
65. The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit / R.B. Salter, D.F. Simmonds, B.W. Malcolm et al. // J. Bone Joint Surg. - 1980. -Vol.62- B, N8. - P. 1232-1251.
66. The effects ofalginate on gene expression and its use for cell delivery in cartilage defects / Diduch D.R., C.M. Mierisch, L. Jordan et al. // Arthroscopy. - 1999. - Vol.7. - P. 531-532.
67. TGF-P gene transfer in articular chondrocytes implication for improved matrix regeneration following chodral injuries in arthritic joints / H.D. Moeller, F.H. Fu, C. Nikibiri et al. // Arthroscopy. - 1999. - Vol.7, Suppl. 1. - P. 58.
68. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation / M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson et al. // N. Engl. J. Med. - 1994. -Vol.331, N14. - P. 889-895.
69. Zukor D.J., Oakeshott D., Brooks P.J. et al. Fresh, small fragment osteochondral allografts for posttraumatic defects of the knee. In: Ewing J.W. (Ed.). Articular cartilage and knee joint function. - New York: Raven Press, 1990 - P. 153-165.

Рукопись поступила 19.03.01.