

- ischaemia on fetal growth of Sprague-Dawley rats. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2002, v. 14, № 5–6, p. 355–361.
8. Ishimura R., Kawakami T., Ohsako S. et al. Suppressive effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on vascular remodeling that takes place in the normal labyrinth zone of rat placenta during late gestation. *Toxicol. Sci.*, 2006, v. 91, № 1, p. 265–274.
9. Krampf E., Chalubinski K., Schatten C. and Husslein P. Does acute hypoxia cause fetal arterial blood flow redistribution? *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 2001, v. 18, № 2, p. 175–177.
10. Nyakas C., Buwalda B. and Luiten P. Hypoxia and brain development. *Prog. Neurobiol.*, 1996, v. 49, № 1, p. 1–51.

Поступила в редакцию 22.01.07
Получена после доработки 12.03.07

MORPHOLOGICAL CHANGES IN FETAL PART OF ALLANTOIC PLACENTA IN RATS EXPOSED TO ACUTE HYPOXIA

L. I. Khozhai, T.T. Shishko, V.B. Kostkin and V.A. Otellin

The aim of this study was to analyze the response of cyto- and syncytiotrophoblast elements of fetal part of allantoic placenta to general acute hypoxia and to determine their morphologic characteristics, which provide the basis for structural changes in placenta and for the disturbances in placental blood flow. Female Wistar rats on day 16 of gestation were exposed to hypoxia (8 %

oxygen concentration in the gas mixture) for 1 hr. Placenta was studied 1 and 3 days later. Short-term acute hypoxia during pregnancy was shown to induce an impairment of formation and maturation of the fetal part of placenta. In the labyrinth zone, apoptosis was enhanced and a significant number of hyperchromatic nuclei appeared in cyto- and syncytiotrophoblast, which lead to the loss of some cells of cytotrophoblast and resulted in the retardation of its development and transformation into syncytiotrophoblast. One day following hypoxia, a stimulation of adaptive processes was evident as demonstrated by a dramatic rise of mitotic activity in the cytotrophoblast of the labyrinth zone of placental fetal part. However, a delay of the labyrinth zone development persisted till the end of pregnancy. Number and volume of fetal blood vessels were decreased as compared to those in control. A sharp decline of number and size of sinusoids containing maternal blood as well as a significant decrease of blood volume in the sinusoids, suggest a spasm of the uterine and placental vessels causing an impairment of utero-placental blood circulation and development of placental insufficiency.

Key words: *placenta, fetal part, trophoblast, hypoxia, placental insufficiency.*

Department of Morphology, RAMS Scientific Research Institute of Experimental Medicine; Laboratory of Nervous System Ontogenesis, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg.

© Р.В. Деев, 2007
УДК 611.018.4:616-003.93:636.92

Р.В. Деев

АНАЛИЗ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТЕЙ КРЫШИ ЧЕРЕПА

Кафедра гистологии и эмбриологии (зав. — проф. Р.К. Данилов) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

На модели дефекта теменных костей кролика ($n=18$) при помощи световой и сканирующей электронной микроскопии и морфометрии изучали закономерности репаративного остеогистогенеза. Показано, что посттравматическая регенерация костей крыши черепа включает основные стадии, характерные и для длинных трубчатых костей: первичной реакции на повреждение, репаративного остеогистогенеза и адаптивной перестройки. На каждой из стадий в регенерате функционируют временные клеточные ассоциации — регенераторные гистионы, которые являются клеточными эффекторами процесса репарации, происходящей на основе закономерностей физиологического остеогенеза, включающего фазы резорбции, реверсии, формирования и покоя. Показано, что к 120-м суткам зона дефекта заполнена преимущественно плотной волокнистой соединительной тканью, что связано с функциональной адаптацией без воздействия сил физической нагрузки.

Ключевые слова: *костная ткань, регенерация, базисные многоклеточные единицы, гистион.*

Способность к репаративному гистогенезу костей крыши черепа существенно ниже, чем трубчатых костей [14, 15]. Представляется целесообразным рассмотреть данное явление с позиции функционирования ассоциации клеток различных дифференцированных — гистионов [4, 5]. Известно, что процесс ремоделирования, или физиологической регенерации, костной ткани является результатом деятельности базисных многоклеточных единиц

(БМЕ) [16, 19], анализ которой эффективен при диагностике и мониторинге лечения остеопороза [6]. БМЕ — это функциональный гистион костной ткани, обеспечивающий ее ремоделирование. При повреждении кости процессы восстановления осуществляют те же основные клеточные элементы, поскольку репаративная регенерация реализуется на основе механизмов физиологической [12], однако гистион в данном случае будет не

физиологическим, а регенерационным. При оценке процесса заживления огнестрельного перелома трубчатых костей на основе комплекса морфологических и статистических методов исследования определены регенерационные гистионы, причем в каждый период восстановительного процесса наиболее выражены определенные их виды [2].

Цель данного исследования — определить закономерности репаративного процесса после механического повреждения теменной кости кролика; дать объяснение этому процессу с позиции учения о гистионе.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 18 взрослых кроликах породы шиншилла обоего пола в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). У животных под калипсоловым наркозом (1 мг/кг) осуществляли доступ к теменной кости. При помощи корончатой фрезы удаляли фрагмент кости диаметром 1,0 см, при этом избегали травмирования твердой оболочки мозга. Рану ушивали. Кусочки, включавшие твердую оболочку мозга, фрагмент теменной кости с дефектом, надкостницу, апоневротический шлем, взятые на 3-, 7-, 15-, 30-, 60-, 90-е и 120-е сутки, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и декальцинировали в перенасыщенном растворе трилона-Б. Препараты для световой микроскопии изготавливали по стандартной схеме. Срезы окрашивали гематоксилином—эозином и по Маллори. Препараты изучали под микроскопом, оснащенном цифровой видеокamerой. Полученные изображения регенератов подвергали морфометрии. Для обеспечения достоверности дефект от края до центра условно делили на четыре зоны (А, В, С, D), в каждой из них определяли долю площади, занимаемой костной тканью по отношению ко всей площади зоны дефекта. Статистическую значимость оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Материал для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, инкубировали в 2,5% растворе трипсина при 37 °С в течение 12 ч, затем в 5% растворе гипохлорида натрия — 30 мин [7, 8]. В дальнейшем препараты обезвоживали в ряду спиртов

возрастающей концентрации, напыляли медью и изучали в сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-35C (Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Результаты исследования. Первичные реактивные изменения, регистрируемые через 3 сут после повреждения, типичны для костной ткани. Костная ткань краев дефекта содержала запустевшие остеоцитарные лакуны, что свидетельствовало о гибели ее участков, вероятно, в результате локального нарушения кровоснабжения. Через 3–7 сут на краю дефекта наружного и внутреннего слоев компактной кости, а также на поврежденных трабекулах обнаруживались остеокласты (рис. 1, а). При изучении краев дефекта с помощью СЭМ выявлены многочисленные зоны с рельефом, характерным для эрозионных лакун (см. рис. 1, б). Практически вся область дефекта была заполнена гематомой, инфильтрированной полиморфноядерными лейкоцитами, отмечено вращение в нее клеток фибробластического ряда.

Признаки репаративного остеогенеза отчетливо выявлялись с 7-х суток. К этому времени со стороны костных краев дефекта формировались короткие трабекулы ретикулофиброзной костной ткани, причем они росли как от периостальной области, так и от стенок костного дефекта. Для близко расположенных к краю дефекта остеонов наружного и внутреннего слоев компактной кости было характерно расширение каналов, заполнение их реактивно измененной рыхлой волокнистой соединительной тканью. Пролиферативной активности клеток твердой оболочки мозга отмечено не было. Гематома в зоне дефекта была разобщена на части тонкими тяжами волокнистой соединительной ткани. Имелся интенсивный неоваскулогенез, сопровождающий посттравматические изменения, и остеогенез в зоне дефекта.

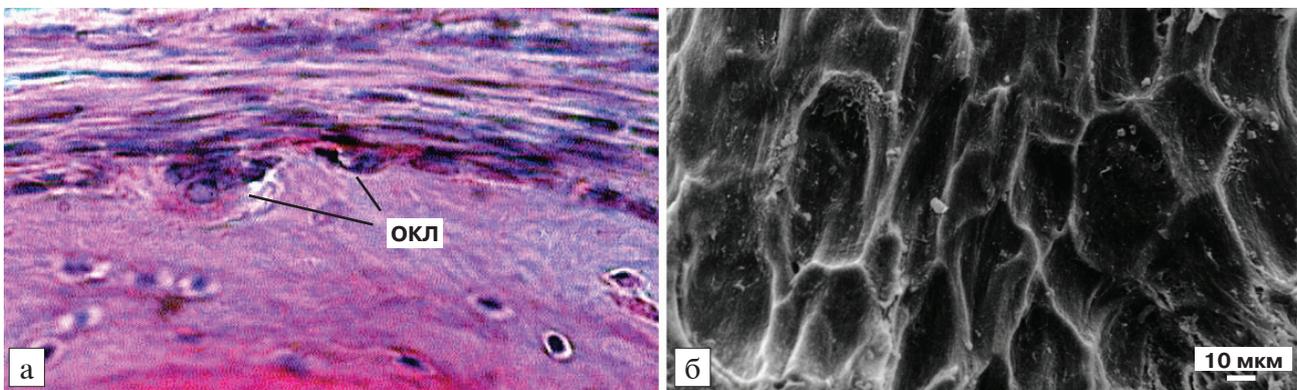


Рис. 1. Наружный слой компактного вещества теменной кости кролика у края дефекта через 3 сут (а) и 7 сут (б) после операции.

ОКЛ — остеокласты. а — окраска гематоксилином — эозином; б — сканирующая электронная микрофотография. а — об. 40, ок. 10.

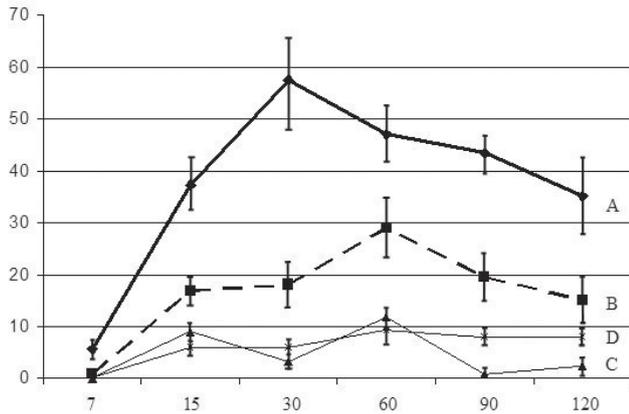


Рис. 2. Доля костной ткани в составе регенерата.

По оси абсцисс — срок наблюдения (сут); по оси ординат — исследованный показатель (%); А — Д — зоны дефекта от края до центра. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

Остеогенез достигал своего максимума к 30–60-м суткам в зонах А и В (рис. 2). Источниками развития костной ткани являлись края дефекта, содержащие элементы периоста, эндоста, твердой оболочки головного мозга, а также мелкие свободнолежащие костные осколки. Вновь образованная костная ткань охватывала края дефекта наподобие муфты. Регенерат в этих зонах был хорошо выражен, васкуляризирован, что отмечалось как при световой микроскопии (рис. 3, а), так и при СЭМ (см. рис. 3, б, в). При помощи последнего метода показано, что новообразован-

ная костная ткань охватывала всю поверхность дефекта, имела большое количество питательных отверстий, что обеспечивало интенсивный метаболизм в зоне активного остеогенеза. Волокна костного матрикса формировали каркас балок ретикулофиброзной костной ткани. В центральных зонах дефекта (С, D) костные трабекулы ретикулофиброзного строения не были связаны с исходной костью. Имелись участки новой кости, сформированной вокруг свободнолежащих костных осколков (рис. 4).

Через 60 сут характер репаративных процессов в зоне повреждения изменился. Вскрытые межтрабекулярные пространства изолировались от дефекта пластинчатой костной тканью, активных очагов остеогенеза не выявлено (рис. 5, а). В центральных участках дефекта определялись отдельные тонкие балки пластинчатой костной ткани. С височной стороны костные балки были несколько лучше выражены, что может быть объяснено лучшим кровоснабжением ветвями височной артерии.

Через 90 сут зона дефекта практически на всем протяжении была заполнена плотной волокнистой соединительной тканью с упорядоченно расположенными коллагеновыми волокнами. По краю дефекта формировался слой пластинчатой костной ткани по типу замыкательной пластинки, что несколько уменьшало его размер. Вблизи замыкательных пластинок признаков остеогенеза не обнаружено.

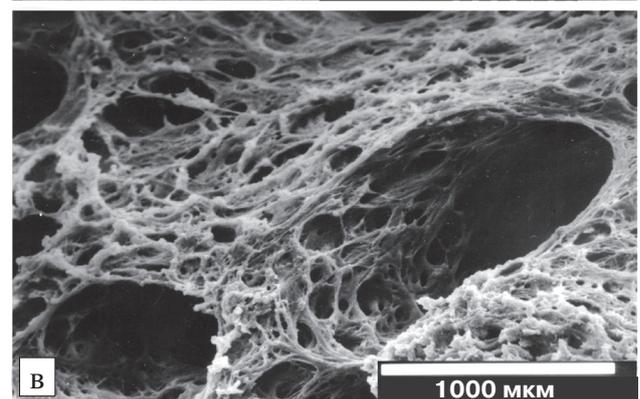
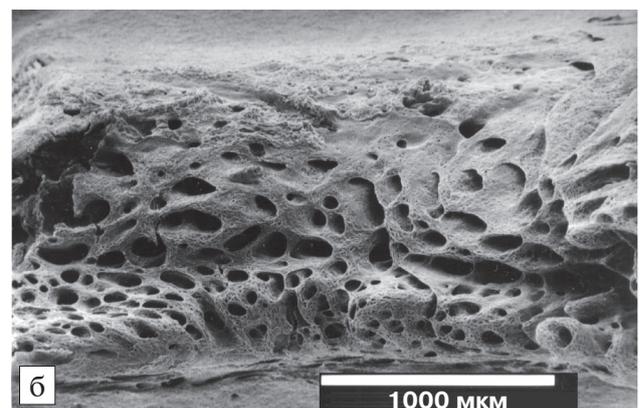


Рис. 3. Регенерат через 15 сут после удаления фрагмента теменной кости у кролика.

РВСТ — рыхлая волокнистая соединительная ткань; РФКТ — ретикулофиброзная костная ткань. а — окраска гематоксилином — эозином; б, в — сканирующие электронные микрофотографии. а — об. 25, ок. 10.

Спустя 120 сут после нанесения дефекта существенных изменений обнаружено не было. Ремоделирование сформированных костных структур привело к замене у краев дефекта остатков ретикулофиброзной костной ткани на пластинчатую. Последняя при изучении в сканирующем электронном микроскопе имела характерный вид наложенных друг на друга костных пластинок (см. рис. 5, б). В зоне дефекта регистрировались отдельные свободнолежащие трабекулы без признаков продолжающегося костеобразования. Височный край формировал тонкий вырост пластинчатой костной ткани, достигающий трети диаметра дефекта. Пространство дефекта было заполнено преимущественно плотной волокнистой соединительной и жировой тканями.

Обсуждение полученных данных. Анализ полученных результатов позволяет сделать заключение о том, что посттравматические изменения в костях свода черепа проходят те же основные стадии, которые описаны для процесса восстановления длинных трубчатых костей: первичной реакции на повреждение, репаративного остеогистогенеза и адаптивной перестройки [1–3]. На каждой из стадий преобладают регенерационные гистионы костной ткани, находящиеся в различной функциональной активности, их совокупность создает характерную для данного срока гистологическую картину регенерата. Большое число остеокластов и очагов резорбции на 3–7-е сутки свидетельствуют о том, что после повреждения клеточные эффекторы в ткани осуществляют резорбцию погибших участков кости, что проявляется активностью остеокласто-макрофагального гистиона.

Считается, что прежде чем произойдет формирование костной ткани в участках повреждения, клетки мононуклеарного ряда подготавливают

костную поверхность [16]. На микропрепаратах в эти сроки обнаруживались картины, характерные для стадии реверсии БМЕ — эрозионные лакуны, заполненные полигональными или округлыми одноядерными клетками (рис. 6). Такой гистион может быть назван макрофаго-остеобластическим. Наибольшая выраженность репаративного остеогистогенеза приходится на 15–30-е сутки, в эти сроки большинство регенерационных гистионов костной ткани во всем регенерате находятся в стадии формирования — остеобластический гистион.

Таким образом, на ранних стадиях превалируют гистионы (БМЕ) в фазе резорбции; в сроки 7–15 сут — реверсии; 15–30 сут — формирования. К 90–120-м суткам большинство регенерационных гистионов костной ткани находятся в фазе покоя, что определяет исход регенерации в данном отделе скелета — дефект кости заполня-

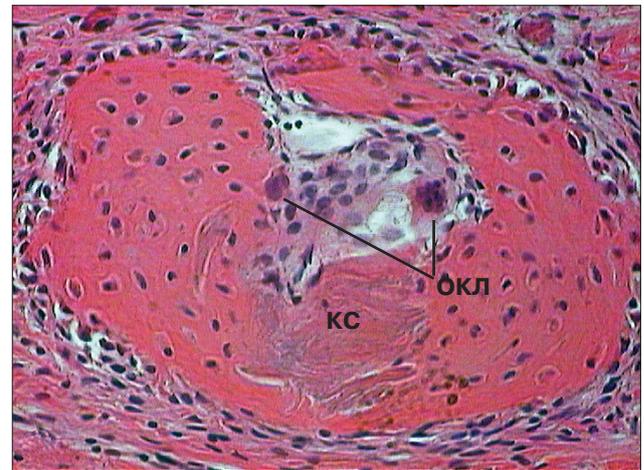


Рис. 4. Свободная трабекула, построенная из ретикулофиброзной костной ткани и сформированная вокруг костного осколка (КО) в центральной части дефекта теменной кости кролика.

ОКЛ — остеокласты. Гематоксилин — эозин. Об. 40, ок. 10

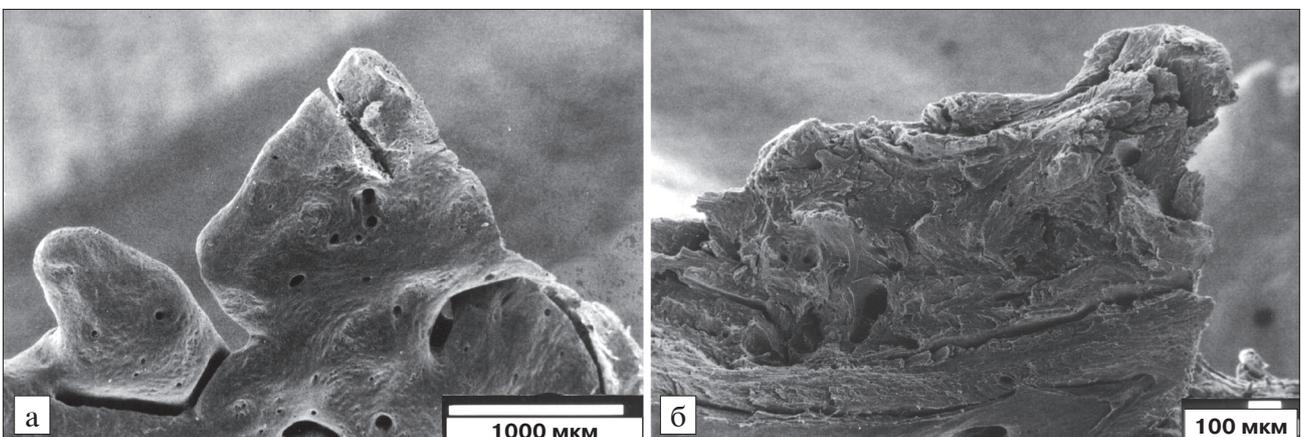


Рис. 5. Краевая часть дефекта теменной кости кролика через 60 сут (а) и через 120 сут (б) после операции.

Сканирующие электронные микрофотографии.

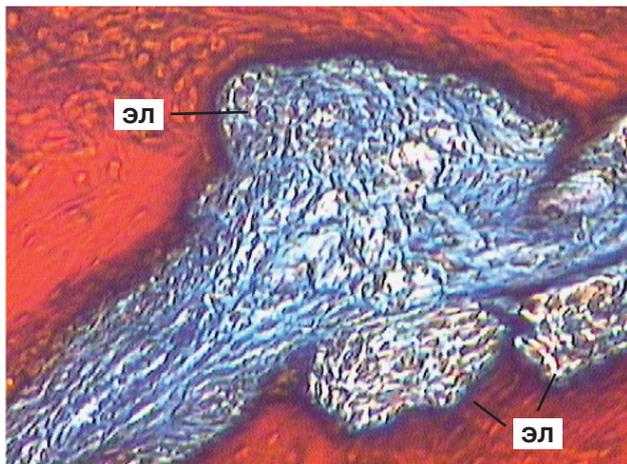


Рис. 6. Формирование костного регенерата, стадия реверсии.

ЭЛ — бывшие эрозионные лакуны, заполненные клетками. Окраска по Маллори. Об. 40, ок. 10.

ется плотной волокнистой соединительной тканью. Причины этого явления можно разделить на 2 группы. Первая — связана с эмбриональным происхождением теменных костей из так называемой эктомезенхимы (нейромезенхимы), производные которой обладают сниженным регенераторным потенциалом. Вторая — заключается в протекании адаптивной перестройки костного регенерата в зоне дефекта костей крыши черепа, которое отличается по воздействующим факторам от такового в костях конечностей. Вместо восстановления костного органа наблюдается процесс транзитного костеобразования — период интенсивного остеогенеза сменяется резорбцией регенерата, о чем свидетельствуют результаты морфометрии. Наиболее характерна эта тенденция для краевых зон дефекта — А и В.

Точка зрения о качественном и количественном отличии остеогенных клеток костей крыши черепа от камбиальных элементов костной ткани иной локализации [9] представляется недостаточно обоснованной. Теменные кости обладают всеми необходимыми источниками остеогенного рассредоточенного камбия для пролиферации и дифференцировки. Это клетки глубокого слоя периоста со стороны апоневротического шлема и со стороны твердой оболочки головного мозга, остеогенный потенциал которой был доказан как культуральными исследованиями [11], так и экспериментами *in vivo* [19]. Кроме того, в межтрабекулярных пространствах имеются клетки эндоста, стромы костного мозга, а также периваскулярные клетки внутри каналов остеонов. Показана высокая индуцибельность остеогенных клеток данных костей к остеогенезу [10]. В настоящем исследовании об этом свидетельствовало образование сети новых трабекул костной ткани вокруг

свободнолежащих костных осколков, являющихся индукторами остеогенеза, что было показано ранее на модели огнестрельных переломов трубчатых костей [1]. На использовании этого явления базируются методы оптимизации остеогенеза костной крошкой, регенерирующей костью и др. [14, 15].

Описаны ряд условий адекватной адаптации костного регенерата к условиям функционирования костного органа. Основная роль в этом процессе, наряду с иммобилизацией, принадлежит воздействию физических сил [13, 17, 18]. Справедливость этого положения подтверждена в экспериментах *in vitro*, в ходе которых в ответ на различные физические воздействия на культуру остеобластов активировалась их остеогенная дифференцировка. В живом организме вектор действия силы необходим костным клеткам для образования «функционального синцития», обеспечивающего их сочетанный ответ на внешние и внутренние стимулы, выработки цитокинового ответа, ремоделирования кости [2]. При репарации в условиях полной иммобилизации, отсутствия мышечной тяги процесс происходит неполноценно [20, 21]. Известно, что при отсутствии дозированной нагрузки у пациентов с травмами костей могут произойти нарушения консолидации [17]. Локализация дефекта в теменной кости исключает естественную мышечную нагрузку. Дозированная дистракция костного фрагмента или регенерата в этой области приводит не только к формированию полноценного костного регенерата, но и к его адаптивной перестройке [18].

Таким образом, кости свода черепа обладают достаточным камбиальным потенциалом для осуществления гисто- и органотипического восстановления. Процесс посттравматической реакции данных костей стереотипен и включает 3 основные стадии, на каждой из которых функционируют регенерационные гистионы костной ткани, реализующие фазы резорбции, реверсии, формирования и покоя. Исход восстановления определяется адаптацией регенерата, протекающей неадекватно вследствие отсутствия действия физической нагрузки. В таких условиях клеточные элементы регенерационных гистионов костной ткани переходят в стадию покоя и резорбции. Собственно сама стадия адаптации и подразумевает перестройку костного регенерата таким образом, чтобы структура органа могла противодействовать регулярно действующим нагрузкам. Так как кости крыши черепа в естественных условиях таких нагрузок не испытывают, остеогистогенез является транзитным, и область дефекта заполняется преимущественно плотной волокнистой соединительной тканью.

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. Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии: гистогенез и регенерация тканей. Труды Воен.-мед. акад., 2004, т. 257, с. 94–109.
3. Гололобов В.Г. и Одинцова И.А. Опорно-двигательный аппарат. В кн.: Гистогенез и регенерация. СПб., Изд-во ВМедА, 2002.
4. Данилов Р.К. Вклад ученых-гистологов Военно-медицинской академии в разработку учения о тканях. Актуальные вопросы гистогенеза и регенерации. Общие принципы организации тканей позвоночных. В кн.: Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии: гистогенез и регенерация тканей. Труды Воен.-мед. акад., 2004, т. 257, с. 11–47.
5. Данилов Р.К., Боровая Т.Г. и Клочкин Н.Д. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и репаративной регенерации тканей (некоторые итоги XX века и перспективы дальнейших исследований). Морфология, 2000, т. 118, вып. 4, с. 7–16.
6. Демпстер Д.В. (Dempster D.W.) Ремоделирование кости. В кн.: Остеопороз. М.–СПб., Бином, Невский диалект, 2000, с. 85–108.
7. Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П. и Матвейчук И.В. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеоартрологии. М., ОАО «Типография «Новости», 2005.
8. Докторов А.А. и Денисов-Никольский Ю.И. Структура эрозивных лакун на периостальной и эндостальной поверхностях кости. Арх. анат., 1985, т. 89, вып. 11, с. 62–69.
9. Зацепин С.Т. Костная патология взрослых: Руководство для врачей. М., Медицина, 2001.
10. Канторова В.И. Индуцибельность остеогенных клеток-предшественников надкостницы костей свода черепа у взрослых кроликов. Онтогенез, 1981, т. 12, № 2, с. 145–153.
11. Канторова В.И. Остеогенные возможности твердой мозговой оболочки в условиях ее культивирования *in vivo* в диффузионных камерах. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 2, с. 449–452.
12. Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей. Л., Медицина, 1984.
13. Корнилов Н.В. и Аврунин А.С. Адаптационные процессы в органах скелета. СПб., Морсар АВ, 2001.
14. Матвеева А.И. Замещение дефектов костей черепа регенерирующей костью. М., Изд-во АН СССР, 1962.
15. Полежаев Л.В. Замещение дефектов черепа регенерирующей костью. Вopr. нейрохир., 1982, № 2, с. 53–57.
16. Родан Г.А. и Родан С.Б. (Rodan G.A. and Rodan S.B.) Костные клетки. В кн.: Остеопороз. М.–СПб., Бином, Невский диалект, 2000, с. 15–55.
17. Шаповалов В.М., Ерохов А.Н. и Ткаченко С.С. Современные проблемы восстановительного лечения раненых и больных ортопедо-травматологического профиля. В кн.: Состояние и перспективы развития военной травматологии и ортопедии. Труды Воен.-мед. акад., 1999, т. 248, с. 518–523.
18. Шевцов В.И., Чиркова А.М. и Дьячков А.Н. Морфологическая характеристика ранних стадий репаративного процесса при замещении дефектов костей черепа методом дозированной distraction (сообщение 2). Вестн. травматол. и ортопед. им. Н.Н. Приорова, 2000, № 1, с. 61–66.
19. Frost H.M. Treatment of osteoporoses by manipulation of coherent bone cell populations. Clin. Orthop., 1979, v. 143, p. 227–244.
20. Meadows T.H., Bronk J.T., Chao E.Y.S. and Kelly P.J. Effect of weight-bearing on healing of cortical defects in the canine tibia. J. Bone Joint Surg., Am., 1990, v. 72a, № 7, p. 1074–1080.
21. Wronski T.J., Morey-Holton E.R., Doty S.B. et al. Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight. Am. J. Physiol., 1987, v. 252, p. R252–R255.

Поступила в редакцию 08.01.07
Получена после доработки 01.03.07

ANALYSIS OF REPARATIVE REGENERATION OF CALVARIAL BONES

R.V. Deyev

The patterns of reparative osteohistogenesis were studied using the model of defects of rabbit parietal bones (n=18) with light and scanning electron microscopy and morphometry. Posttraumatic regeneration of cranial calvarial bones was shown to include main stages, which were also characteristic for long tubular bones, such as: primary response to trauma, reparative osteohistogenesis and adaptive remodeling. In every stage, temporary cellular associations are functioning within the regenerate. These are regenerative histions which are cellular effectors of reparative process based on the regularities of physiologic osteogenesis including the phases of resorption, reversion, formation and rest. By day 120 the injured area was shown to be filled predominantly with dense connective tissue, which is associated with functional adaptation without the action of physical load.

Key words: *bone tissue, regeneration, basic multicellular units, histion.*

Department of Histology and Embryology, S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg.