

Экспериментально – гистологический анализ результатов гетеротопических трансплантаций хрящевой ткани, покрытой белково – тромбоцитарной оболочкой

И.В. Крайник ¹, И.В. Гайворонский ², Р.В. Деев ³, В.В. Михайлов ⁴, А.И. Крайник ¹

¹ Национальный Медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова, Москва

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

³ Институт стволовых клеток человека, Москва

⁴ Северо-Западный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

Experimental and histological analysis of the heterotopic transplantation results of cartilage covered with protein-platelet membrane

I.V. Krajnik ¹, I.V. Gajvoronskij ², R.V. Deev ³, V.V. Mihajlov ⁴, A.I. Krajnik ¹

¹ N.I. Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow

² S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg

³ Human Stem Cells Institute, Moscow

⁴ Mechnikov Northwest State Medical University, Saint-Petersburg

В работе представлены результаты эксперимента по свободной трансплантации ауто- и аллогенной хрящевой ткани ушной раковины, обработанной и не обработанной плазмой, обогащенной тромбоцитами, которая после полимеризации на фрагменте хрящевой ткани образует белково-тромбоцитарную оболочку (БТО). В работе использован гистологический и иммуногистохимический метод (выявление CD163⁺-клеток). Установлена динамика тканевых реакций. Показано, что наиболее быстро при подкожной имплантации деградирует и резорбируется аллогенная хрящевая ткань без БТО, наиболее медленно – аутохрящ с БТО. При этом сохраняющаяся как минимум 2 нед. БТО является субстратом для формирования соединительнотканной капсулы. При этом динамика тканевых событий вполне соответствует классическим представлениям о протекании репаративных процессов после повреждения: альтерации, фагоцитоза тканевого детрита – как составного звена воспалительной реакции и развития грануляционной ткани, ее «созревании».

Ключевые слова: хрящевая ткань, трансплантация, пластическая хирургия, плазма, обогащенная тромбоцитами.

Проблема выбора тканевого материала для выполнения реконструктивных вмешательств остается высоко актуальной для современной пластической хирургии, несмотря на многолетнюю историю исследований в этой области [1–5]. Современная реконструктивная хирургия последствий травм и заболеваний носа связана с хирургическим изменением или восстановлением хрящевых и костных структур, что достаточно часто сопровождается появлением осложнений и нежелательных последствий [5–7]. Ряд авторов для профилактики осложнений предлагают прокладки из различных ауто- и алломатериалов, помещенных между костно-хрящевыми структурами и кожей спинки носа [8–10]. Синтетические материалы, например силикон, могут самопроизвольно смещаться в тканях, вызывать пролежни или даже отторгаться, причинять болевые или неприятные

The paper presents the results of experiments on free transplantation of auto- and allogeneic cartilage ear treated and not treated with platelet-rich plasma, which forms a protein-platelet membrane (BTO) after polymerization on a cartilage fragment. We used histological and immunohistochemical analysis (identification of CD163⁺-cells). Dynamics of tissue reactions was defined. It was shown that allogeneic and resorbed cartilage without BTO in subcutaneous implantation the most rapidly, but autochondrilage with the BTO degraded the most slowly. At the same time, continuing for at least 2 weeks the BTO is a substrate for the formation of a connective tissue capsule. The dynamics of tissue events is consistent with classical ideas about the course of reparative processes after injury: alteration, phagocytosis of tissue detritus as an integral link of the inflammatory response and granulation tissue development, its «maturation».

Key words: cartilage tissue, transplantation, plastic surgery, platelet-rich plasma.

ощущения [5, 8]. Многие авторы [11–13] предлагают в случае возникновения послеоперационных неровностей спинки носа и незначительных асимметрий сместить акцент в оперативном лечении с трансплантации на инъекционную имплантацию. В разное время предлагались способы устранения западений спинки носа такими материалами, как затвердевающие пластмассы, парафин [1], силиконовые гелевые композиции [14], полиакриламидные гели [13]. Однако эти материалы часто отторгались ввиду того, что данные инородные тела не обладали биоинертностью [2, 15]. К инъекционным методам можно также отнести введение измельченных ауто- и аллохрящей через шприц. Первый способ был предложен С.А. Проскуряковым [16], второй А.А. Лимберг [3]. Метод шприцевого введения не нашел практического применения в связи с рас-

e-mail:romdey@gmail.com

сыванием измельченных хрящей. Л.Л. Павлюченко [4, 17] проанализировал достоинства и недостатки ауто- и алломатериалов, используемых в настоящее время для контурной ринопластики, и отметил, что ауто- и аллохрящи по прежнему являются востребованным материалом, несмотря на их рассасывание. Другие специалисты предлагают использовать для устранения седловидных деформаций так называемое «турецкое лакомство», которое представляет собой фрагменты перегородочного, ушных и крыльных аутохрящей, измельченные до размера 0,5–1 мм³, смешанные с 1 мл цельной крови больного. Образовавшаяся смесь крови и хрящевых фрагментов заворачивается в Surgicel (рассасывающееся гемостатическое средство из окисленной регенерированной целлюлозы) и после придания имплантату цилиндрической формы вводится под кожу спинки носа [18]. Между тем эффективность практического применения данной идеи, по нашему мнению, значительно снижается из-за наличия противопоказаний и осложнений при использовании препарата Surgicel и противоречивых механизмов действия связующей хрящевую массу цельной крови, возможного рассасывания хрящевых графтов [3]. Распад эритроцитов в кровяном сгустке ведет к высвобождению лизосомальных ферментов, которые повреждают хрящевые графты и способствуют их рассасыванию.

На важную роль кровяного сгустка в склеивании и заживлении раны обратил внимание Н.И. Пирогов [19], и рекомендовал обязательно орошать кровью края сухожилий при тенотомии [20]. Гораздо позже, уже в XX в. многими исследованиями было доказано значение тромбоцитов в процессах регенерации тканей в ране. Так, в 1968 г. с этой целью в Калифорнийском университете впервые была использована обогащенная тромбоцитами плазма [21]. В дальнейшем она нашла широкое применение в кардиохирургии под названием «тромбоцитарный концентрат» или «тромбоцитарный гель», а затем и в хирургической стоматологии (богатая тромбоцитами плазма-БотП) — для улучшения качества регенерата и ускорения интеграции имплантированных анкером [22, 23]. В последние годы заметным явлением в реконструктивной и пластической хирургии стало использование в качестве важного элемента трансплантата аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP) [23, 24]. Считается, что заключенные в ней в большом количестве везикулы с разнообразными факторами роста, регуляторными цитокинами и ферментами способствуют как выживанию трансплантата, так и в определенной степени индуцируют вектор дифференцировки тканей в реципиентном ложе, являясь, таким образом, важным тканеинженерным компонентом [25, 26]. Кроме того, белково-тромбоцитарные покрытия часто используется и самостоятельно. Во время дегрануляции тромбоциты высвобождают большое количество веществ, обеспечивающих первичный гемостаз, и факторов роста. К таким веществам относятся: серотонин, катехоламины, ADP, фибриноген, фибронектин, ATP, фактор V, фактор VIII (фон Виллебранда), тромбоксан A2, кальций. К факторам роста относятся: полученные из тромбоцитов фактор роста (PDGF), фактор ангиогенеза (PDGF), трансформирующий фактор роста бета (TGFβ), инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор роста

эндотелиальных клеток (PD-ECGF) [23]. Возникает первоначальный толчок процесса регенерации, «запуск» каскада регенерационного цикла, который продолжает формировать регенерат [24]. БотП имеет также свойство модулировать и повышать функционирование одних факторов роста в присутствии других. Этот аспект отличает факторы роста, содержащиеся в плазме, от других факторов роста, которые обладают самостоятельным действием и отвечают только за какой-то один аспект регенерации. Фибриновый компонент БотП обеспечивает связывание отдельных костных и хрящевых фрагментов, образуя сеть, препятствующую миграции и способствующую их приживлению в конкретном участке [24], после полимеризации тканевый фрагмент оказывается покрытым белково-тромбоцитарной оболочкой.

Цель настоящего исследования — выявить в эксперименте влияние белково-тромбоцитарной оболочки (БТО) на судьбу пересаженных хрящевых ауто- и аллотрансплантатов, ее воздействие на раневой процесс и время существования в ране.

Материал и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 12 кроликах породы Шиншилла (питомник РАН «Рапполово») средним весом 2,5 кг. Получение хрящевых пластинок осуществлялся из ушной раковины (рис. 1А). В две стерильные пробирки, содержащие стандартное количество (1 мл) официального раствора цитрата натрия, получали 10 мл крови. Пробирки центрифугировали на скоростных режимах, не допускающих разрушение эритроцитов. Плазма с тромбоцитами забиралась и помещалась в отдельную стерильную стеклянную посуду небольшого размера (кружка, чашка Петри и др.). В плазму помещали ауто- и аллохрящи и другие используемые в эксперименте материалы, в качестве катализатора процесса полимеризации белка добавляли 10% раствор хлористого кальция в соотношении 3–4 капли на 1 мл плазмы. В течение 10–15 мин, слегка встряхивая смесь плазмы с катализатором, добивались запуска процесса полимеризации белков плазмы. Образовывалась гелеобразная плазменная субстанция, внутри которой находились хрящевые пластинки. После отжима марлевой салфеткой на хрящах образовывалась тонкая белковая оболочка, в состав которой входят тромбоциты из данной порции плазмы. На дорзальной поверхности кролика паравентрально с двух сторон выбривали площадку, слева от позвоночного столба в контроле трансплантировались пластинки ауто- и аллохряща, справа — хрящевые пластинки, покрытые БТО.

Все манипуляции с животными выполнялись при неукоснительном соблюдении правил гуманного обращения с животными. Операции выполнены после премедикации и после введения животного в фармакологический наркоз.

Материал для гистологического исследования получали через 1, 2, 3, 4, 8 и 36 нед. Препараты подвергали рутинному гистологическому процессу обработки; срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование выполнялось с использованием коммерческих антител к CD163 и системы визуализации EnVision (DakoCytomation, Дания).

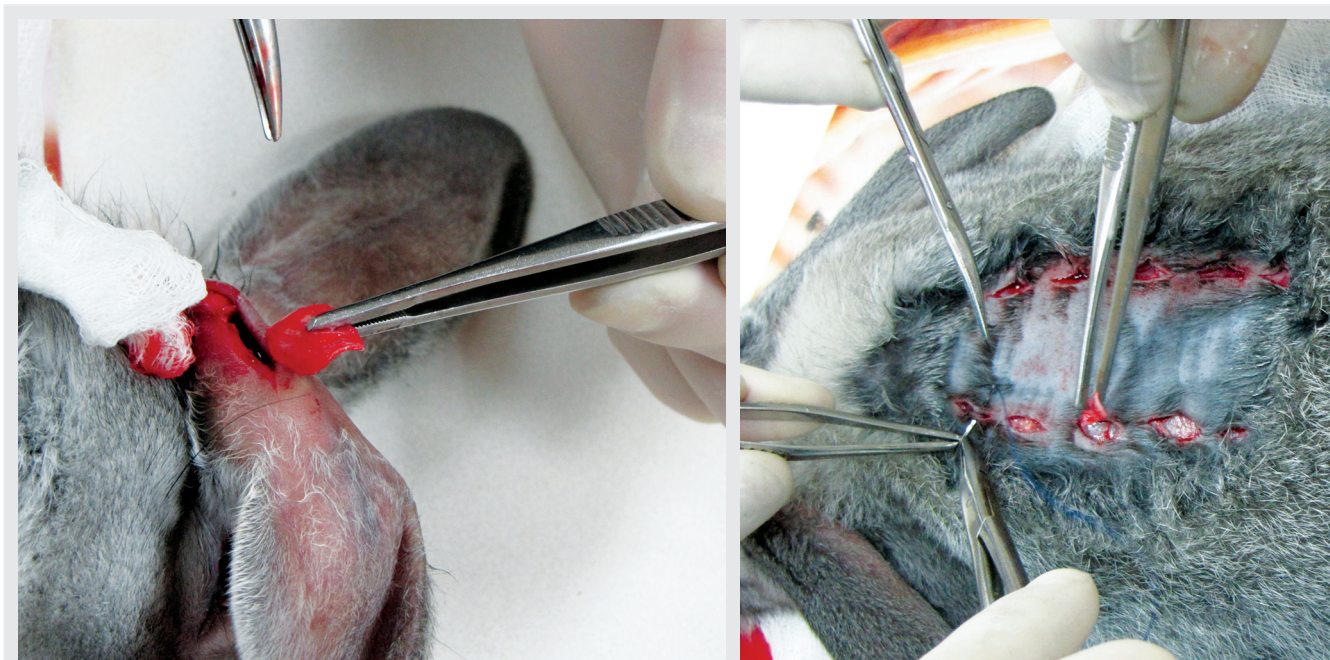


Рис. 1. Этапы операции: А – выделение хрящевого фрагмента ушной раковины; Б – подкожная имплантация тканевых фрагментов

Результаты и обсуждение

Динамика тканевых реакций после подкожной трансплантации фрагмента аутогенного хряща ушной раковины

Трансплантация аутогенной хрящевой ткани

Через 1 нед. после перемещения фрагмента аутогенного хряща ушной раковины под кожу регистрируются лишь минимальные изменения: тинкториальные свойства хрящевого матрикса сохранены; в участках, прилегающих к надхрящнице и (или) непосредственно переходящих в нее имеются еди-

ничные мелкие одиночные двоядерные хондроциты (рис. 2А). Матрикс в областях, переходящих в перихондрий, оксифильный. В некоторых локусах фрагмента хрящевой ткани, в основном в непосредственной связи с надхрящницей могут быть обнаружены как локальные хондроцитарные «пролифераты» (рис. 2Б), так и участки аппозиционного роста, которые, однако, не достигают больших размеров.

Граница между надхрящницей и окружающими тканями визуализируется хорошо. Вокруг трансплантата расположена реактивно измененная соединительная ткань с большим количеством крове-

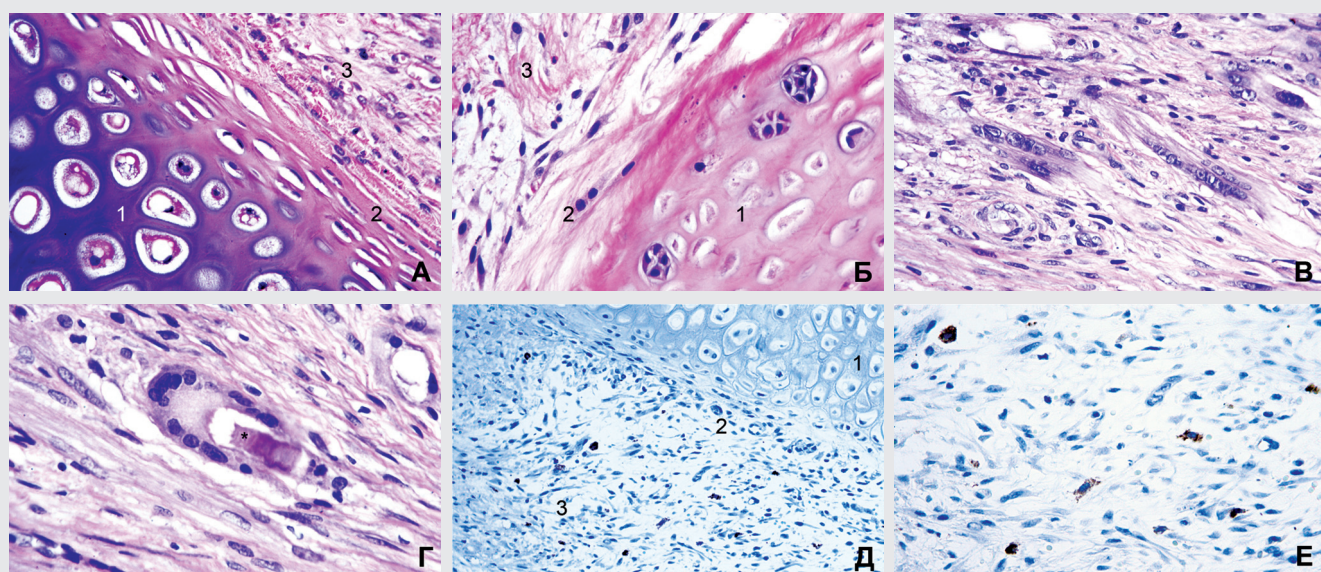


Рис. 2. Хрящевой аутоотрансплантат через 1 нед. после гетеротопической пересадки под кожу (подробное описание в тексте): 1 – хрящевая ткань трансплантата; 2 – надхрящница трансплантата; 3 – грануляционная ткань; * – фрагмент тканевого детрита. Окраска: А–Г – гематоксилин и эозин; Д, Е – ИГХ-реакция с антителами к CD163, продукт реакции окрашен диаминобензидином в коричневый цвет; докраска гематоксилином. Ув.: А–В, Е $\times 250$; Г $\times 400$; Д $\times 100$

носных сосудов (грануляционная ткань). На данном этапе посттравматического процесса в различных ее участках можно обнаружить организующиеся кровоизлияния, поля нежнопетлистых скоплений фибрина. Однонаправленными группами расположены фибробласты и миофибробласты. На участках интраоперационного повреждения мышечной ткани отмечаются признаки репаративного рабдомиогенеза (рис. 2В), которые следует отличать от единичных гигантских многоядерных клеток (рис. 2Г), реализующих фагоцитоз мелких фрагментов тканевого детрита. Лейкоцитарная инфильтрация отсутствует.

При проведении иммуногистохимической реакции с антителами к CD163 (мембранный белок клеток линии моноциты-макрофаги) установлено, что через 1 неделю после операционного повреждения тканевые макрофаги — гистиоциты в небольшом количестве локализованы в грануляционной ткани, т.е. находятся на удалении от аутоотрансплантата (рис. 2Д). Данные клетки одиночны, полиморфны (рис. 2Е); как правило, расположены на небольшом удалении от капилляров или иных сосудов.

Таким образом, состояние хрящевого аутоотрансплантата свидетельствует о том, что он удовлетворительно переживает гетеротопическую трансплантацию, более того — демонстрирует некоторые признаки незначительного роста. В этот период альтеративная и экссудативная фазы посттравматического воспаления уже пройдены и сменяются пролиферативной фазой, в ходе которой продолжается умеренный фагоцитоз оставшихся элементов гематомы и тканевого детрита, прорастание структур регенерата фибробластами, синтез ими нежной коллагеновой капсулы, которая может быть измерена и составляет в среднем $333,5 \pm 88,6$ мкм (по удалению от надхрящницы (табл)).

Через 2 нед. в области перемещенного аутохряща произошли некоторые изменения, которые, преимущественно затронули окружающие ткани реципиентного ложа. Сам свободный аутоотрансплантат не претерпел существенных изменений за исключением тех участков, на которых не было надхрящницы на момент пересадки — т.е. с его торцов (места срезов) (рис. 3А). В данных областях произошла очаговая

Толщина соединительнотканной капсулы (мкм) в различных сериях эксперимента

Группа	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	8 нед.	36 нед.
1 (аутохрящ)	$333,5 \pm 88,6$	343 ± 203	$155 \pm 31,8$	$98,1 \pm 24,2$	$287 \pm 49,7$	178 ± 59
2 (аутохрящ+БТО)	$304 \pm 49,4$	716 ± 182	$202 \pm 73,7$	$156 \pm 19,9$	$143 \pm 63,4$	$111 \pm 33,5$
3 (аллохрящ)	$219,5 \pm 41,8$	$311 \pm 83,1$	167 ± 23	$190 \pm 31,2$	$208 \pm 93,4$	—
4 (аллохрящ+БТО)	$333,5 \pm 97,1$	146 ± 37	$164 \pm 32,2$	$127 \pm 47,2$	$256 \pm 99,3$	232 ± 76

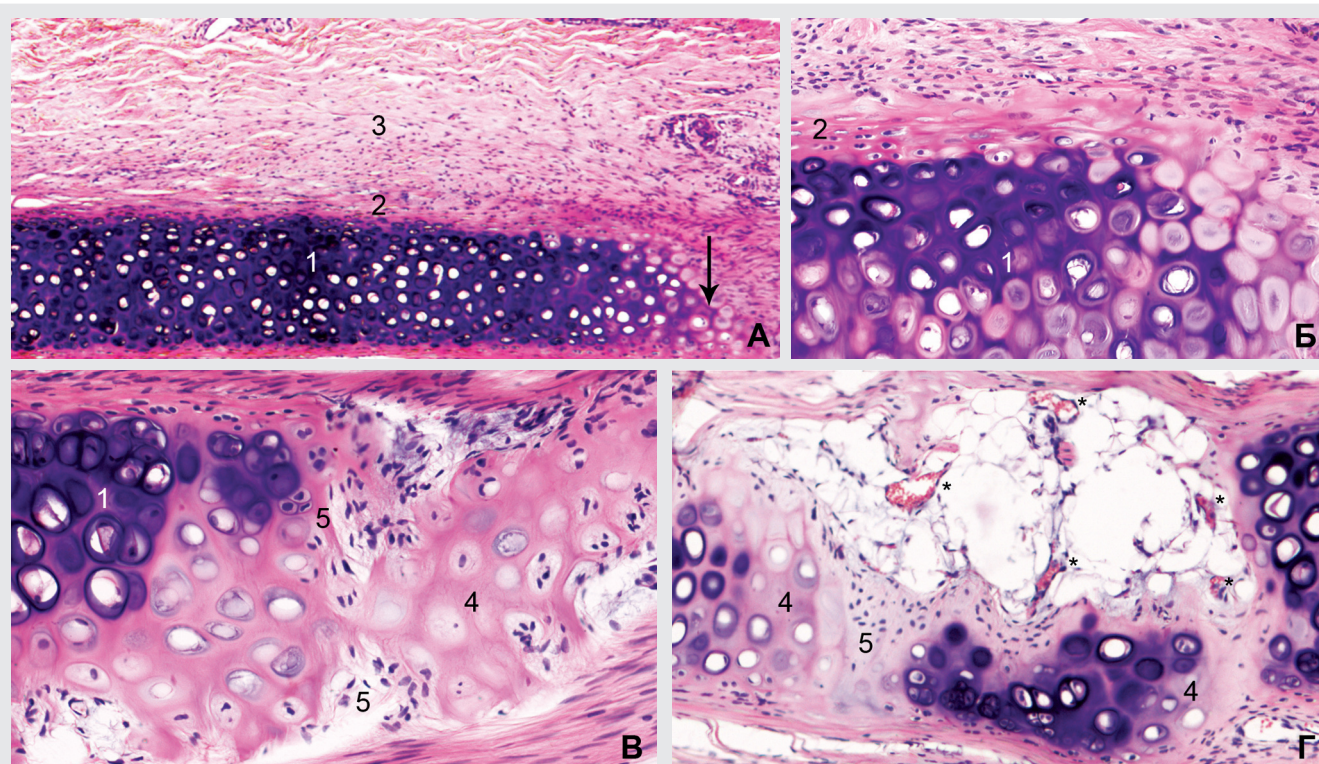


Рис. 3. Хрящевой аутоотрансплантат после перемещения под кожу: А, Б — через 2 нед.; В, Г — через 8 нед.; 1 — хрящевая ткань трансплантата; 2 — надхрящница; 3 — волокнистая соединительная ткань формирующейся капсулы; 4 — резорбируемые участки хрящевой ткани; 5 — растущая реактивно измененная соединительная ткань с кровеносными сосудами (*). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А $\times 100$; Б–Г $\times 250$

потеря базофилии матрикса, часть хондроцитарных лакун в мозаичном порядке были заполнены оксифильным гомогенным содержимым (рис. 3Б). Жизнеспособные клетки могли быть обнаружены в участках, прилегающих к надхрящнице и непосредственно в ней.

Прилегающая грануляционная ткань характеризовалась большей «зрелостью», о чем свидетельствовали толстые оксифильные прослойки коллагена. Однако, между надхрящницей и более дистально расположенными тканями имелся пояс с большим содержанием фибробластоподобных клеток, наиболее вероятно — дифференцирующихся фиброцитов и миофибробластов. Количество микрососудов, которое могло быть визуальным образом определено на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, снизилось по сравнению с картиной, наблюдаемой через 1 нед. после повреждения.

Морфометрический анализ показал, что выраженность соединительнотканной капсулы не претерпела существенной динамики и составила 343 ± 203 мкм, т. е. не имела значимых отличий по сравнению с предыдущим сроком наблюдений.

Таким образом, в хрящевом трансплантате через 2 нед. происходят деструктивные изменения в участках, не покрытых надхрящницей. В окружающих тканях завершается процесс организации грануляционной ткани, постепенно заключающих аутоотрансплантат в «нежную» соединительнотканную капсулу.

Еще через неделю (3 нед.) капсула вокруг хрящевого аутоотрансплантата сформирована, причем она не сращена с окружающими тканями и легко вылушивается при изготовлении препарата. Состояние (сохранность) хрящевого матрикса можно охарактеризовать как удовлетворительное, в то время как обнаружить жизнеспособные хондроциты практически не представляется возможным. В большей части надхрящницы имеются слои жизнеспособных фибробластоподобных клеток. Аналогичная картина обнаружена и при изучении препаратов хрящевого аутоотрансплантата с 4-недельной экспозицией в гетеротопическом реципиентном ложе.

Через 2 мес. (8 нед.) хрящевой аутоотрансплантат характеризуется удовлетворительной сохранностью в большей части объема. Однако, следует отметить, что резорбтивные процессы набирают силу. Так, со стороны торцов трансплантата — участков, лишенных надхрящницы, наблюдается прогрессия резорбции (рис. 3В). Хрящевая пластинка в этом месте истончена, оксифильна, причем мозаичная оксифилия распространяется и далее от торца вглубь ткани. Границы фрагмента ткани узурированы, изрезаны — за счет врастающих в резорбционные лакуны элементов реактивно измененной соединительной ткани, а также кровеносных сосудов. Особенно важно, что такие изменения на указанном сроке выявляются не только по торцам пластинки хрящевой ткани, но и в центральных участках (рис. 3Г). Тонкая волокнистая капсула, по-видимому, не препятствует этому, несмотря на то, что на этом сроке наблюдений она представлена относительно плотно упакованными коллагеновыми волокнами, совокупной толщиной до $287 \pm 49,7$ мкм. Вместе с тем, следует констатировать хорошее прокрашивание ядер в клетках перихондра, что свидетельствует о сохранении его жизнеспособности и возможности диффузного питания.

Через 36 нед. состояние хрящевого аутоотрансплантата свидетельствует о прогрессировании деструктивных процессов в типичных местах. Однако, следует указать, что все же большая часть пересаженных под кожу трансплантатов сохранила свою структурную целостность. Преимущественно это характерно для участков, покрытых неповрежденной при хирургических манипуляциях надхрящницей.

Капсула вокруг трансплантата на этот срок представляет собой параллельно расположенные пучки толстых коллагеновых волокон рыхло связанных между собой. Причем, совокупная их толщина не превышает 178 ± 59 мкм.

Таким образом, гистологический анализ материала данной серии свидетельствует о последовательном протекании в гетеротопическом реципиентном ложе закономерных процессов деградации тканевого фрагмента хряща, которые происходили медленно как в связи с его аутогенным происхождением, со структурными особенностями хрящевого матрикса, так и с его брадитрофностью; а также — воспаления, развития грануляционной ткани и ее организации в тонкую капсулу вокруг тканевого фрагмента. При этом начиная с 8 нед. срока отмечаются весьма существенные деструктивные процессы в хрящевой пластинке (при учете, что ее толщина около 1 мм = 1000 мкм), что, однако, не приводит к полной резорбции хряща даже через 9 мес. (36 нед.) после пересадки.

Трансплантация хрящевой ткани, покрытой белково-тромбоцитарной оболочкой

Состояние хрящевых аутоотрансплантатов, покрытых перед трансплантацией БТО и окружающих тканей на всех сроках эксперимента характеризовалось сходной динамикой, но отличалось рядом заметных признаков. Через неделю после гетеротопической трансплантации состояние собственно хрящевой части трансплантата подтверждает динамику, выявленную в предыдущей группе. Вместе с тем, в данном случае отмечается несколько большая активация перихондральных клеточных элементов (рис. 4А). Причем, в тех участках хряща, на которых БТО полимеризовалась, не равномерно происходит активное врастание грануляционной ткани. В ряде случаев тяжи реактивно измененной соединительной ткани инвазировались в надхрящницу (рис. 4Б). Сама БТО визуализируется в виде гомогенной оксифильной массы, инкрустированной эритроцитами. Следует отметить, что на поверхности она уже покрыта тонкослойной соединительнотканной капсулой (см. рис. 4А).

Через 2 нед. после гетеротопического переноса аутохряща, покрытого БТО, под кожу отмечается существенное истончение и резорбция БТО — оксифильная гомогенная оболочка трансплантата заметно истончена по отношению к предыдущему сроку наблюдений, в некоторых местах резорбирована полностью. В ее толщу вдаются «языки» реактивно измененной соединительной ткани, в ряде случаев с сосудами. Состояние хрящевой ткани — удовлетворительное, признаки резорбции наблюдаются только по торцам — в местах, лишенных перихондра и с резорбированной БТО. Следует отметить рыхлое расположение коллагеновых волокон, что сказывается на морфометрическом подсчете — выраженность капсулы достигает 716 ± 182 мкм.

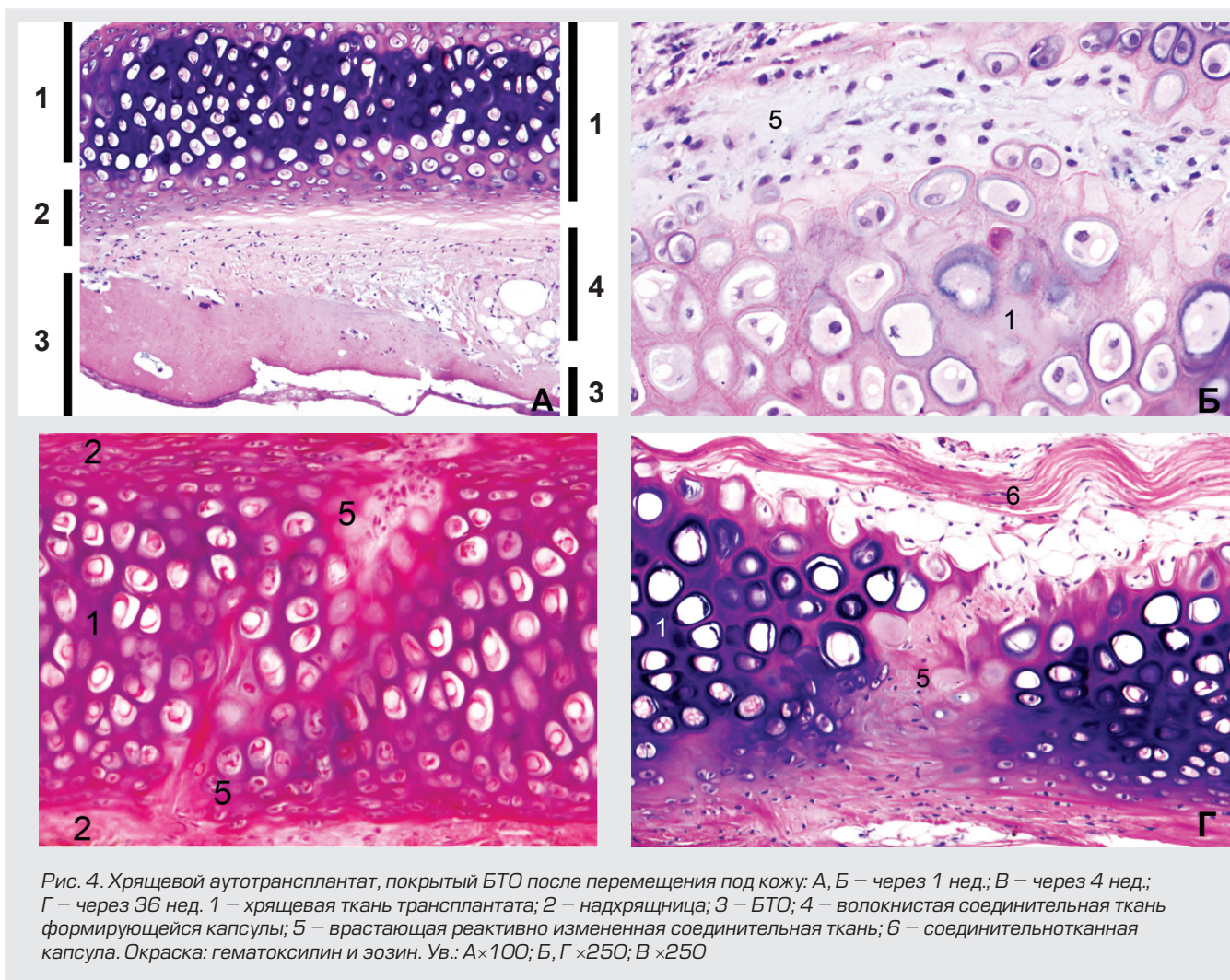


Рис. 4. Хрящевой аутоотрансплантат, покрытый БТО после перемещения под кожу: А, Б – через 1 нед.; В – через 4 нед.; Г – через 36 нед. 1 – хрящевая ткань трансплантата; 2 – надхрящница; 3 – БТО; 4 – волокнистая соединительная ткань формирующейся капсулы; 5 – врастающая реактивно измененная соединительная ткань; 6 – соединительнотканная капсула. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А×100; Б, Г×250; В×250

Существенных изменений на сроке 3 нед. по сравнению с предыдущей группой не выявлено, необходимо подчеркнуть лишь большую толщину слоистой соединительнотканной капсулы вокруг трансплантата – $202 \pm 73,7$ мкм. Состояние хрящевой ткани трансплантата остается фактически неизменным – структурная целостность матрикса и его тинкториальные свойства не изменены. Однако, отмечается некоторое потускнение окрашивания гематоксилином ядер клеток перихондра, что может свидетельствовать о нахождении их в парабитическом состоянии с потерей основных витальных потенций, включая способность к пролиферации и дифференцировке.

Через месяц после выполнения операции в трансплантат начинают врастать элементы соединительной ткани, чем инициируется процесс деградации фрагмента хрящевой ткани. О клеточном составе врастающих тканевых элементов высказаться сложно, с равной вероятностью приходится предполагать как врастание компонентов реципиентного ложа, так и дифференцирующихся структур собственного перихондра аутоотрансплантата (рис. 4Б). Подобные изменения длительное время не несут драматических последствий для хрящевого аутоотрансплантата, покрытого БТО. Даже через 9 мес. структура хрящевой ткани в основном сохранена и, не смотря на идущую деградацию, трансплантат не фрагментирован и не

резорбирован полностью (рис. 4Г). В участках, где происходило врастание соединительной ткани, отмечается умеренное замещение хрящевого матрикса: между оксифильными гомогенными массами расположены редкие фибробластоподобные клетки с мелкими базофильными ядрами; как правило, под волокнистой капсулой в этих местах имеются участки, заполненные адипоцитами.

При исследовании толщины формирующейся капсулы, следует констатировать ту же закономерность, что и в первой серии, а именно – на сроке 1–2 нед. происходит бурное развитие грануляционной ткани в реципиентном ложе и посттравматическое воспаление, что ведет к формированию достаточно большого объема грануляционной ткани. Последняя, дифференцируясь, формирует слоистую соединительнотканную капсулу (плотная оформленная волокнистая соединительная ткань) к 3–4 нед. Морфометрически этот процесс сопровождается уменьшением ее толщины с 716 ± 182 и $202 \pm 73,7$ мкм на 2 и 3 нед. соответственно, на уровне 150 мкм через 1–2 мес. происходит стабилизация, данная тенденция сохраняется и в дальнейшем – $111 \pm 33,5$ мкм, в финале эксперимента.

Таким образом, гистологический анализ материала данной серии свидетельствует о последовательном протекании в гетеротопическом реципиентном ложе закономерных процессов деградации тканевого

фрагмента хряща, который происходит медленнее, чем в предыдущей серии, что, по видимому, связано с более выраженным образованием соединительнотканной капсулы в случае если хрящевой ауто-трансплантат покрыт БТО, которая не только может участвовать в регуляции гистогенетических процессов в окружающих тканях, но и механически препятствует быстрому врастанию реактивных элементов соединительной ткани и быстрой резорбции хрящевого фрагмента.

Динамика тканевых реакций после подкожной трансплантации фрагмента аллогенного хряща ушной раковины

Трансплантация аллогенной хрящевой ткани

Через 1 нед. после помещения свободного аллогенного хрящевого фрагмента под кожу наблюдается раннее формирование плотной капсулы (рис. 5А); непосредственно к надхрящнице прилежит слой плотноупакованных, ориентированных параллельно поверхности хряща мощных пучков коллагеновых волокон. Глубже волокнистая соединительная ткань приобретает менее оформленную структуру, при этом отмечается умеренная лимфоцитарная инфильтрация. Также обнаруживаются островки жировой ткани, очаги организации образованных в ходе операции микрогематом, некротизированные мышечные волокна.

Состояние хрящевого матрикса может быть охарактеризовано как удовлетворительное: его тинкториальные свойства и целостность не нарушены, хондроциты перихондрия хорошо прокрашены, что косвенно свидетельствует об их жизнеспособности.

У некоторых животных отмечаются большие поля грануляционной ткани на стадии «созревания» — т.е. замещающейся рыхлой волокнистой соединительной

тканью с большим количеством активных фибробластов, формирующих своеобразный «муаровый» рисунок регенерата в этой области (рис. 5Б).

При иммуногистохимическом выявлении гистиоцитов (CD163-положительных клеток) установлено, что они функционируют в грануляционной ткани и могут быть обнаружены как в участках активного врастания сосудов и деятельности полиморфных фибробластоподобных клеточных элементов, так и в поврежденной поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани (рис. 5В). Гистиоциты имеют преимущественно вытянутую форму, с отростками; расположены тесно, кучно. Отмечается тенденция к параваскулярному расположению клеток, что может свидетельствовать о миграции их в область посттравматического воспаления с током крови, а не только участие клеток из местных резервов рыхлой волокнистой соединительной ткани. Следует отметить существенное отличие по сравнению с тканевыми реакциями на свободную ауто-трансплантацию хрящевого фрагмента — в данном случае фагоциты располагаются в непосредственной близости от алло-хряща, что, по-видимому, обусловлено антигенностью пересаженного материала.

Спустя еще неделю, на фоне большего фибро-зирования окружающих трансплантат тканей и формирования слоистой капсулы необходимо констатировать изменение хрящевого матрикса — в нем формируется большое количество дефектов, очагами матрикс не воспринимает стандартные красители. Причем, как и в предыдущих наблюдениях, данное явление в большей степени наблюдается вблизи торцов срезов фрагментов хрящевой ткани. В некоторых участках, без каких либо закономерностей, со стороны надхрящницы в хрящевой матрикс врастают тяжи реактивно измененной соединительной ткани, резорбирующие аллогенную хрящевую ткань.

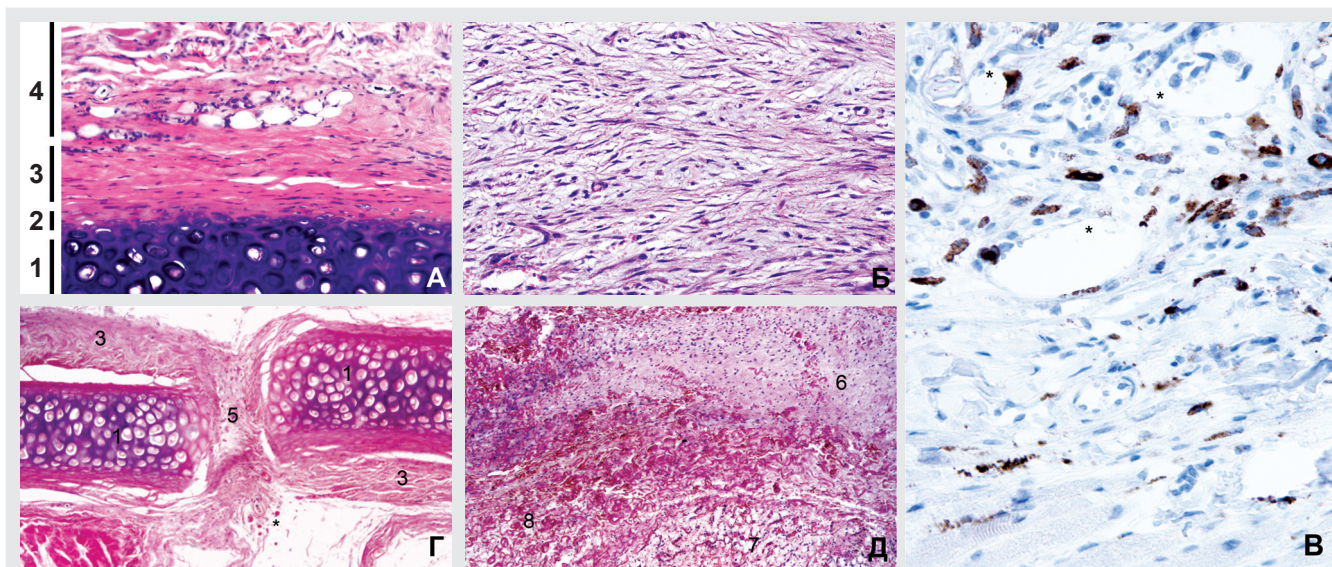


Рис. 5. Аллотрансплантат хрящевой ткани после перемещения под кожу: А–В – 1 нед.; Г – 3 нед.; Д – 36 нед. 1 – хрящевая ткань трансплантата; 2 – надхрящница, без четких границ переходящая в капсулу; 3 – соединительнотканная капсула; 4 – рыхлая волокнистая соединительная ткань с умеренной лимфоцитарной инфильтрацией; 5 – врастающая реактивно измененная соединительная ткань; 6 – участок с превалированием аморфного компонента матрикса; 7 – жировая ткань с умеренной лимфоцитарной инфильтрацией; 8 – волокнистая соединительная ткань. Окраска: А, Б, Г, Д – гематоксилин и эозин; В – ИГХ-реакция с антителами к CD163, продукт реакции окрашен диаминобензидином в коричневый цвет; докраска гематоксилином. Ув.: А, Г, Д $\times 100$; Б $\times 200$; В $\times 400$

Через три недели после перемещения аллогенного хрящевого фрагмента процессы деградации несколько замедлены, что, по-видимому, связано с тем, что вокруг фрагмента хрящевой ткани уже сформирована достаточно плотная соединительнотканная капсула. Вместе с тем, наряду с изменением тинкториальных свойств хрящевого матрикса обнаруживается бледное прокрашивание ядер хондроцитов и хондробластов надхрящницы. В некоторых участках констатируется врастание элементов реактивно измененной соединительной ткани, причем в ряде случаев это приводит к перфорированию и фрагментации хрящевой пластинки (рис. 5Г); при этом во врастающем тканевом комплексе имеется большое количество микрососудов.

Толщина капсулы в этот срок достигает значения 167 ± 23 мкм, что существенно меньше, чем за неделю до этого ($311 \pm 83,1$ мкм). И на этом сроке и позднее выраженной инфильтрации лимфоцитами в связи с антигенностью пересаженной ткани не обнаруживается.

Медленно прогрессирующий процесс разрушения чужеродного хряща приводит к тому, что в конце эксперимента — через 9 мес. — хрящевая ткань полностью элиминируется из реципиентного ложа (рис. 5Д).

Вместо хрящевой ткани обнаружены участки волокнистой соединительной ткани разной степени зрелости и упорядоченности волокон.

Имеются небольшие участки с относительно гомогенным аморфным матриксом, насыщенным мелкими фибробластоподобными клетками; однако больший объем представлен именно волокнистым вариантом соединительной ткани, причем коллагеновые волокна, как правило, представлены короткими мощными извитыми пучками. Помимо волокнистой ткани имеются поля, состоящие из жировой ткани, в ряде случаев с лимфоцитарной инфильтрацией. Таким образом, во время эксперимента аллогенный хрящ, несмотря на раннее формирование капсулы, резорбируется, оставляя на месте себя механически непрочную волокнистую соединительную ткань.

Динамика тканевых реакций после подкожной трансплантации фрагмента аллогенного хряща ушной раковины, покрытого белково-тромбоцитарной оболочкой

Несколько иная гистологическая картина наблюдается при перемещении под кожу аллогенного хряща ушной раковины, покрытого БТО. Отграничение антигенного материала белково-тромбоцитарной оболочкой приводит к тому, что соединительнотканная капсула вокруг хряща формируется значительно раньше, а именно — уже через 1 нед. хрящевая пластинка покрыта изолирующим соединительнотканным слоем толщиной до $333,5 \pm 97,1$ мкм (рис. 6А). Следует отметить, что при этом надхрящница подвергается

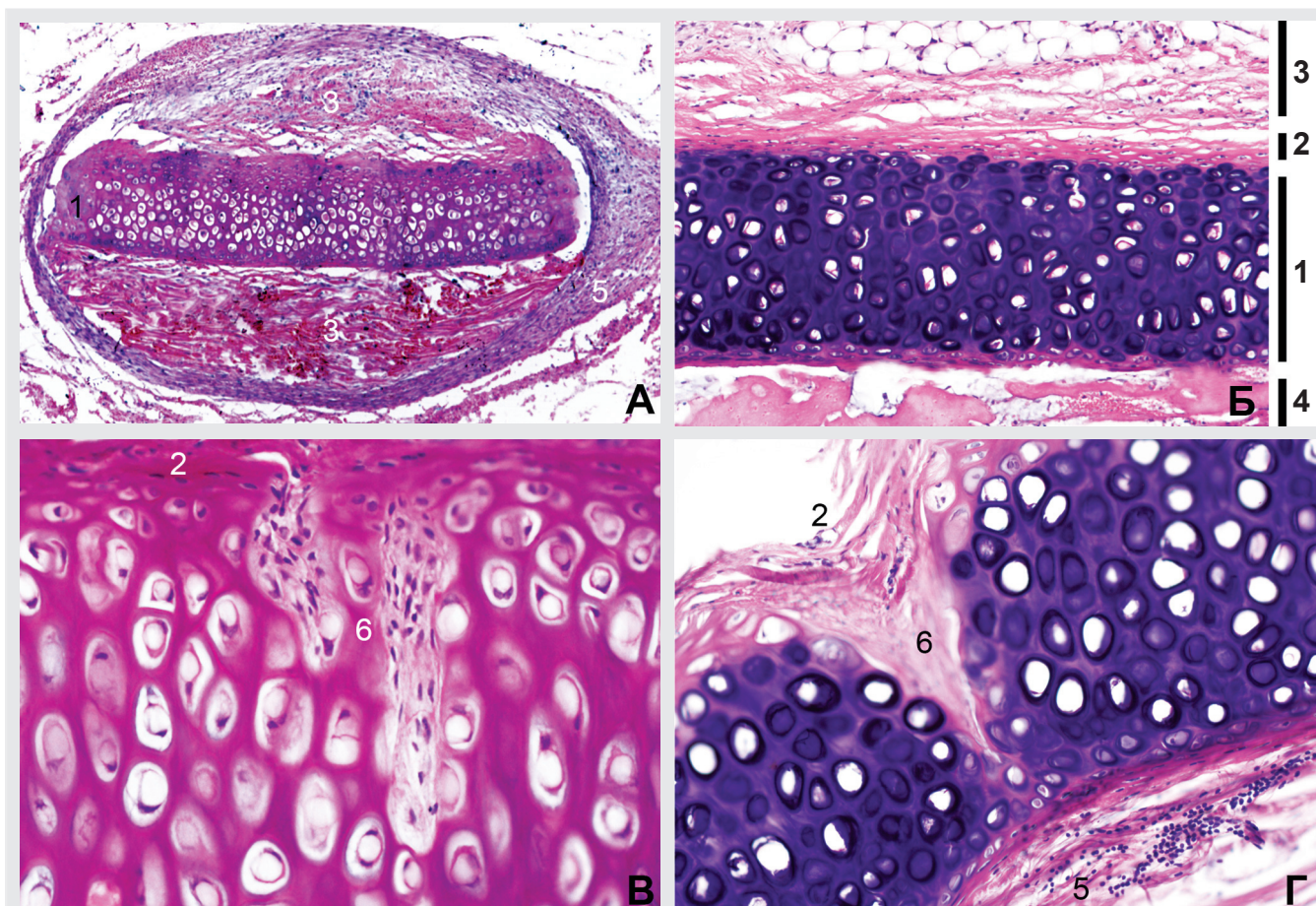


Рис. 6. Аллогенный хрящ, покрытый БТО, после перемещения под кожу: А, Б — через 1 нед.; В — 4 нед.; Г — 36 нед.; 1 — пластинка хрящевой ткани; 2 — надхрящница; 3 — волокнистая соединительная ткань; 4 — БТО; 5 — соединительнотканная капсула, в некоторых участках с умеренной лимфоцитарной инфильтрацией; 6 — врастающие со стороны перихондра тяжи реактивно измененной соединительной ткани. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А $\times 40$; Б $\times 100$; В $\times 250$; Г $\times 200$

прогрессивному развитию — она становится источником пролиферации соединительнотканых волокнистых компонентов, заполняющих пространство внутри капсулы. В некоторых наблюдениях (у других экспериментальных животных) на этом сроке БТО еще не подвергнута резорбции и может быть идентифицирована по характерному гомогенному виду и оксифильной окраске (рис. 6Б). Следует подчеркнуть, что состояние хрящевого матрикса остается неизменным по сравнению с нативным хрящом.

Важной находкой является тот факт, что в краевых зонах хрящевой пластинки обнаруживаются хондроцитарные пролифераты, аналогичные тем, которые были обнаружены в аутогенном хрящевом материале. Причем окружающая эти области надхрящница и собственно хрящ богаты мелкими хондробластическими элементами, окраска ядер которых свидетельствует о пролиферативных процессах. Таким образом, будучи пересаженными в чужой организм клетки аллогенного тканевого материала, изолированные от внутренней среды при помощи БТО демонстрируют существенные жизненные потенции. По видимому, такой эффект недостаточно объяснять лишь изолирующим эффектом БТО, вероятно, факторы роста и иные регуляторные молекулы, имеющиеся в ней, также вносят свой вклад в растормаживание внутриклеточных процессов в живых тканях.

В дальнейшем, пролиферативные изменения аллотрансплантата не получают сколько нибудь выраженного развития. Так, уже *через месяц* можно обнаружить врастающие в хрящевой матрикс со стороны перихондра тяжи реактивно измененной соединительной ткани (рис. 6В). Состояние матрикса при этом следует расценивать как удовлетворительное — в большей части хондроцитарных лакун просматриваются как вакуолизированные тела клеток, так и прокрашенные ядра. Сам матрикс сохраняет свою структурную целостность. Окружающая соединительнотканная капсула принимает обычные размеры и составляет около 150 мкм.

Процесс деградации аллогенного хряща замедлен по сравнению с предыдущей серией. Самым красноречивым свидетельством этого являются результаты, полученные на крайнем сроке наблюдения — через 9 мес. В отличие от пересадки чистого аллогенного хряща, после покрытия БТО хрящ сохраняется в

реципиентном ложе (рис. 6Г). Он фрагментирован за счет врастания соединительной ткани, которая, судя по всему, происходит из слоистой соединительнотканной капсулы. Сам хрящевой матрикс, несмотря на субтотальную гибель хондроцитов и хондробластов, частично сохраняет тинкториальные свойства и структурную целостность.

Жизнеспособные клеточные элементы обнаружены только в надхрящнице — в виде мелких веретеновидных клеток с удлинёнными ядрами. Однако достоверно высказаться об их происхождении (из соединительнотканых элементов реципиентного ложа или из донорской надхрящницы) по использованным в данном исследовании методам — невозможно. Обращает на себя внимание наличие небольших лимфоцитарных инфильтратов вблизи аллогенного тканевого материала.

Таким образом, данные, полученные в сериях с использованием аллогенного хряща, свидетельствуют о том, что БТО приводит в конечном итоге к более длительному сохранению хрящевых трансплантатов в реципиентном ложе, причем различия в исходах кардинальные — от полной резорбции без БТО, до относительной сохранности после обертывания белком в срок, как минимум, до 9 мес.

Проведенное исследование позволило установить ряд важных для проведения клинико-экспериментальных параллелей фактов о динамике тканевых реакций, происходящих как в трансплантатах, так и в реципиентном ложе, в зависимости от наличия полимеризованной белково-тромбоцитарной оболочки.

При трансплантации ауто- и аллохрящевой ткани БТО сохраняется в течение двух недель и предотвращает быструю резорбцию свободного хрящевого трансплантата. Поскольку ауто- и аллотрансплантаты и без того демонстрируют длительный срок переживания в гетеротопическом ложе, то в большей степени данный эффект выражен при пересадках аллогенной хрящевой ткани. При этом динамика тканевых событий вполне соответствует классическим представлениям о протекании репаративных процессов после повреждения: альтерации, фагоцитоза тканевого детрита — как составного звена воспалительной реакции и развития грануляционной ткани, ее «созревании».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Богораз Н.А. Восстановительная хирургия. М.: Медгиз, 1949; 1: 392.
2. Добрякова О.Б., Добряков Б.С., Добряков Б.Б. и др. Старые и новые способы в контурной пластике носа. Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии 2010; 3: 30–39.
3. Лимберг А.А. Опорная и контурная пластика размельченным хрящом. Вестн. хир. 1957; 7.
4. Павлюченко Л.Л. О трансплантатах при пластике носа. Комментарий к статье И.Л. Ишмамметьева и соавт. Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии 2010; 1: 36–40.
5. Пшениснов К.П. Осложнения в эстетической хирургии носа и вторичная ринопластика. Избранные вопросы пластической хирургии 2001; 1(6): 24.
6. Фришберг И.А. Эстетическая хирургия лица. М.: Академкинга, 2005; 276.
7. Parkes M.L., Kanodia R., Machida B.K. Revision rhinoplasty. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1992; 118: 695–701.
8. Ишмамметьев И.Л., Ишмамметьев И.И., Старостина В.В. и др. Применение аллотрансплантата из твердой мозговой оболочки для хирургического устранения и профилактики неровностей спинки носа. Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии 2010; 1: 23–33.

9. Gilmore J. Use of vicryl mesh in prevention of postrhinoplasty dorsal irregularities. Ann. Plast. Surg. 1989; 22(2): 105–7.
10. Gryskiewicz J.M., Rohrich R.J., Reagan B.J. The use of allderm for the correction of nasal contour deformities. Plast. Reconstr. Surg. 2001; 107(2): 561–70.
11. Dobryakova O.B. Fillers and silicon implants in rejuvenated rhinoplasty. Conference book of 5th European Congress in Aesthetic Dermatology and Surgery. Paris, 2009: 41.
12. Passy S. Non surgical rhinoplasty — a new way to correct nasal deformities with PMMA implant / S. Passy // Abstract book 22nd International Congress of the French Society of Aesthetic Surgery. Paris, 2005: 26–7.
13. Tenenbaum A. Quick and easy rhinoplasty. Abstract book 23rd International Congress of the French Society of Aesthetic Surgery. Paris: 2006: 15–6.
14. Южелевский Ю.А., Соколов С.В. Силоксановые эластичные материалы для эндопротезирования. Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева 1982; 27(2): 132–7.
15. Yi C.X. The evaluation of complications following augmentation rhinoplasty silicon gel. Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai KoTsa Chich 1991; 7(3): 191, 192, 239.
16. Проскуряков С.А. Восстановительные операции носа, горла, уха. Новосибирск: Новосибирск, 1947: 408.
17. Павлюченко Л.Л. Некоторые особенности выбора аллохрящевой трансплантата и способа его фиксации при коррекции

седловидной деформации носа. Комментарий к статье И.Л. Ишмаметьева и соавт. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии* 2009; 4: 41–51.

18. Султанова Н.Н. Применение «турецкого лакомства» при устранении седловидной деформации носа. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии* 2008; Приложение: 134.

19. Пирогов Н.И. О пластических операциях вообще, о ринопластике в особенности. Лекция, читанная в Императорской С.-Петербургской Академии Наук доктором медицины Н. Пироговым 9-го декабря 1835 г. Санкт-Петербург, 1835: 34.

20. Пирогов Н.И. О перерезке ахиллова сухожилия как оперативно-ортопедическом средстве лечения. *Дерпт*, 1841: 65.

21. Urist M.R., Strates B.S. Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* 1972; 50: 1392.

22. Бондаренко О.В. Комплексная оценка дентальной имплан-

тации в области аугментации после травматического удаления зубов [диссертация]. М., 2010.

23. Брехов В.Л. Хирургическое лечение больных с дефектами костной и хрящевой тканей с применением богатой тромбоцитами аутоплазмы [диссертация]. Курск, 2007.

24. Гарг А. Применение богатой тромбоцитами плазмы с целью увеличения эффективности костных трансплантатов при использовании в области стоматологических имплантов. *Dental-Market* 2002; 5: 40–2.

25. Marx R.E., Carison E.R., Eichstadt R.M. et al. Использование богатой тромбоцитами плазмы для повышения эффективности костных материалов. *Dental-Market* 2004; 1:22–7.

26. Pertungaro P.S. Применение богатой тромбоцитами плазмы крови с факторами роста (аутогенный тромбоцитарный гель) для улучшения заживления твердых и мягких тканей в хирургической имплантологии. *Dental-Market* 2002; 6: 26–7.

Поступила 27.04.2012

Система для проведения экстракорпорального фотофереза – UVAR XTS («Therakos», США)

Экстракорпоральный фотоферез представляет собой метод, основанный на сочетании лейкофереза и облучения лейкоцитов, предварительно обработанных фотосенсибилизатором (8-метоксипсораленом), ультрафиолетовым светом диапазона А (320 – 400 нм).

Область применения:

Лечение онкологических, аутоиммунных, дерматологических и пролиферативных заболеваний:

- кожная Т-клеточная лимфома
- уменьшение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ)
- предотвращение отторжения органов после трансплантации
- склеродермия
- дерматиты
- ревматоидный артрит
- псориаз

Особенности системы:

Безопасность для пациента:

- одноразовая система расходных материалов
- исключение риска воздушной эмболии
- исключение риска заражения
- осуществление контроля поступления антикоагулянта
- контроль давления в системе
- контроль скорости забора и возвращения крови пациенту
- возможность изменения параметров процесса в течение процедуры
- при необходимости автоматическая блокировка системы магистралей

Простота в работе и обслуживании:

- удобное использование для оператора
- конструкция аппарата и расходных материалов исключает возможность ошибки при загрузке
- однократная венопункция
- полная автоматизация процедуры
- быстрое и безопасное извлечение компонентов процедурного набора после завершения процедуры
- наличие ключа данных, на котором фиксируется вся информация о протекании процесса



Система для выделения стволовых клеток – Serax («BioSafe», Швейцария)

- Самая современная, компактная, мобильная система, позволяющая выделять гемопоэтические стволовые клетки из пуповинной, периферической крови, костного мозга, а также осуществлять их отмывку после криохранения
- Идеальная система для быстрой автоматической обработки крови или ее компонентов с высоким уровнем жизнеспособности клеток после процедуры
- Serax позволяет проводить 9 протоколов (выделение стволовых клеток, концентрация стволовых клеток и их отмывка)
- Принцип действия Serax основан на сепарации центрифугированием, позволяющем разделять компоненты крови в соответствии с их плотностью и размером
- Система предназначена для применения в онкогематологии и клеточной терапии (регенеративной медицине), где необходимо получение определенных компонентов крови
- Обработка крови или ее компонентов происходит в закрытой одноразовой стерильной системе
- Компоненты крови собираются в специальные мешки и готовы для дальнейшего использования (криоконсервация, наращивание *in vitro*, трансплантация, др.)

Эксклюзивный представитель ООО «Инновационные медицинские технологии»
Москва, ул. Ивана Франко, д. 4, корп. 15, тел/факс: +7(495)380-36-62
E-mail:

dr_fedorov@haemoline.ru, gerasimenkov@haemoline.ru, neunylovamv@delrus.org



Автоматизированная система для хранения стволовых клеток в жидком азоте – BioArchive («Thermogenesis», США).

Система рассчитана на 3626 образцов стволовых клеток

- Низкая стоимость операционного процесса
- Низкий расход жидкого азота на один образец во время хранения и программного замораживания
- Полностью автоматизированный процесс сокращает время работы персонала
- Снижение затрат на оборудование
- Не требуется большого количества дьюаров для хранения (одна система BioArchive заменяет 6-7 дьюаров)
- Наличие двух встроенных программных замораживателей
- Безопасность и защита
- Полузакрытая система сокращает воздействие азота на оператора
- Источник бесперебойного питания позволяет разместить/извлечь образец в случае отключения электричества
- Параметры 24-х часового контроля и управления доступом включают в себя: Мониторинг уровня жидкого азота
- Пароль для доступа
- ID номер для оператора, хранящийся в базе данных

Интегрированный программный замораживатель

- Минимизирует температурные колебания
- Отсутствует этап ручного переноса образца из программного замораживателя в дьюар для хранения

Криоконтейнер на 25 мл

- Постоянный геометрический размер образца
- Воспроизводимый процесс заморозки для каждой единицы
- Возможность роботизированной закладки на хранение и извлечения образцов
- Снижается вероятность ошибки, связанной с человеческим фактором

Система управления образцом

- Использование штрих-кода исключает ошибки при перемещении образца
- Отчет по образцу: История образца
- Инвентаризация
- График замораживания

www.imt-stemcells.ru

Расходные материалы для культивирования стволовых клеток «CellGenix» (Германия):

Комплекты CellGro для культивирования клеток в закрытых системах

- CellGro HPC для культивирования гемопоэтических клеток, NK-клеток, Т-клеток
- CellGro DC для культивирования дендритных клеток

Бессывороточные среды CellGro:

- SCGM для культивирования гемопоэтических прогениторных клеток, NK-клеток, Т-клеток
- DC для культивирования дендритных клеток

Культуральные мешки VueLife

(сделаны из FEP Teflon)

CellGro цитокины

Для увеличения гемопоэтических прогениторных клеток, NK-клеток, Т-клеток и дендритных клеток



Вся продукция зарегистрирована и сертифицирована в России

