

Н. А. Галатенко, Г. А. Пхакадзе, Е. С. Савицкая, Н. Н. Буфнуц

ВОЗМОЖНОСТЬ УСИЛЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНИ ПУТЕМ ПОВЫШЕНИЯ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В УСЛОВИЯХ ТКАНЕВОГО ДЕФЕКТА

Изучено влияние полимерного препарата пролонгированного действия, содержащего левамизол, на процессы регенерации двух типов соединительной ткани. Показана возможность ускорения процессов регенерации за счет повышения степени дифференцировки клеточных элементов в месте имплантации.

Введение. Проблеме повышения степени дифференцировки клеточных элементов соединительной ткани как при различных патологических процессах [1—3], так и в процессе репаративной регенерации [4, 5] уделяется большое внимание. Следовательно, поиск биологически активных соединений, способных влиять на дифференцировку клеток, и исследование механизма их действия являются весьма актуальными.

Одним из таких соединений может быть левамизол, принадлежащий к имидазольной группе и широко применяемый в качестве иммуномодулятора при различных патологических процессах. Его действие заключается в повышении степени дифференцировки клеточного звена иммунитета. Можно предположить подобный механизм действия левамизола и по отношению к другим клеточным элементам, находящимся при патологических условиях на низком уровне дифференцировки. В пользу этого предположения свидетельствуют положительные результаты использования данного препарата в клинике в случаях, связанных с торможением степени дифференцировки клеточных элементов соединительной ткани — хронических воспалительных процессах, коллагенозах [6—8]. Эти свойства левамизола, по нашему мнению, особенно важны при иммобилизации его на полимерном носителе с использованием последнего в качестве материала для пластики органов и тканей. В этом случае левамизол может выступать как стимулятор дифференцировки клеточных элементов на всех этапах асептического воспаления по мере контролируемого выхода его из биодеструктируемой полимерной матрицы и замещения матрицы тканевым регенератом.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было изучение влияния левамизола, входящего в состав биодеструктируемой пенополиуретановой матрицы, на процесс дифференцировки клеточных элементов в зоне имплантации.

Материалы и методы. Левамизол иммобилизован на пенополиуретановой основе, нетоксичной [9] и способной постепенно деструктурировать в организме с контролируемым выходом лекарственного вещества. Изучали процессы регенерации при имплантации полимерного препарата пролонгированного действия в подкожно-жировую клетчатку и при пластике кости черепа, так как последняя является также высокоспециализированной разновидностью соединительной ткани [10].

Опыты проведены на 120 белых беспородных крысах, которым подкожно имплантировали пенополиуретановые губки (размером 1×1×0,2 см) с различным содержанием левамизола. Контролем служила аналогичная губка без препарата. Исследовали имплантат с окружающими и замещающими его тканями через 1, 2, 4, 12, 24 недели после операции. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином, микрофуксином по Ван-Гизон и Гомори на кислую фосфатазу. Количественную оценку процесса регенерации проводили морфометрическим методом, определяя площади тканевого регенерата, замещающего полимерный имплантат на всех сроках исследования. Кроме того, делали подсчет количества макрофагальных элементов в тканевом регенерате в 20 полях зрения.

Операции по пластике черепа были проведены на 24 кролях породы Шиншилла. После получения трепанационного дефекта размером около 4 см² его заполняли указанным полимером с 10 %-ным содержанием левамизола и аутогенной стружки, которая являлась дополнительным источником малодифференцированных клеточных эле-

ментов. Гистологический материал декальцинировали, обрабатывали по обычной гистологической методике, окрашивали пикрофуксинном по Ван-Гизон и гематоксилин-эозином, после чего проводили морфологический анализ препаратов. Контролем служили животные, у которых пластика дефекта черепа была осуществлена полимерным имплантатом без левамизола.

Результаты и обсуждение. Как известно [11], основным показателем перехода клеток из мало- в высокодифференцированное состояние является приобретение ими способности активного выполнения специфической функции. В условиях асептического воспаления одной из активных функциональных единиц являются макрофагальные элементы, секретирующие во внешнюю среду вещества, играющие важную роль в процессах пролиферации и дифференцировки клеток фибробластического ряда и продукции ими коллагена. Степень дифференцировки клеточных элементов соединительной ткани на различных этапах асептического воспаления отражает также синтез коллагена и формирование на месте имплантата соединительнотканного регенерата [12].

В результате исследования было установлено, что наиболее активным соединением в плане ускорения процессов регенерации оказалась полимерная композиция с 6 %-ным содержанием левамизола. Морфологические исследования места имплантации показали, что уже через неделю на границе между капсулой и полимером, а также в порах полимера с грануляционной тканью отмечается более выраженная макрофагальная реакция по сравнению с контролем. Отличия наблюдались как в количественном (табл. 1), так и в качественном отношении. Макрофагальные элементы имели более крупные размеры, полиморфную цитоплазму с большим количеством вакуолей. Более интенсивна в данном случае и пролиферативная активность фибробластов, характеризующаяся формированием молодой грануляционной ткани, замещающей поли-

Таблица 1

Замещение полимерных имплантатов соединительной тканью по данным морфометрических исследований (%) (n=7)

The replacing of polymers implants by the connective tissue according to morphometric investigation

Содержание левамизола, %	Сроки исследования, сут			
	7	14	30	60
9	7,13±0,85	10,32±0,94	13,41±1,34	20,96±1,07
8	7,35±1,25	10,84±1,13	15,04±2,56	21,03±1,09
6	29,15±1,35	49,95±5,25	52,73±3,87	60,19±2,09
4	10,39±1,31	27,06±3,01	38,32±6,68	41,64±4,51
2	9,76±0,95	11,96±1,09	22,19±1,78	27,10±0,86
1,6	9,03±0,76	10,82±1,04	18,11±1,51	22,41±2,38
Контроль	8,43±2,19	9,34±1,52	12,77±0,51	18,96±1,15

Таблица 2

Количество макрофагов в грануляционной ткани в 20 полях зрения (n=7, M±m)

The number of macrophages in granulative tissue in 20 microareas

Содержание левамизола, %	Сроки исследования, сут			
	7	14	30	60
9	2,21±0,30	8,61±1,02	22,03±1,33	30,00±1,42
8	3,20±0,51	21,25±2,75	40,51±2,56	45,25±3,28
6	19,25±0,62	42,00±1,08	136,00±7,23	157,75±6,78
4	4,83±0,91	25,75±3,01	66,25±5,06	85,25±3,07
2	2,23±0,50	16,75±1,62	28,26±1,62	41,75±2,98
1,6	2,02±0,42	9,32±1,06	23,77±1,09	35,41±3,26
Контроль	2,10±0,25	8,24±0,15	22,73±1,62	33,75±1,98

мерный имплантат (табл. 2). Через 14 сут после имплантации происходит значительное увеличение количества макрофагальных элементов в тканевом регенерате (табл. 1) в отличие от контроля. Крупные макрофаги, нагруженные мелкогранулярным содержимым, определяются как по краю имплантата, так и в глубине соединительнотканной капсулы. Происходит активное замещение полимерного имплантата соединительно-

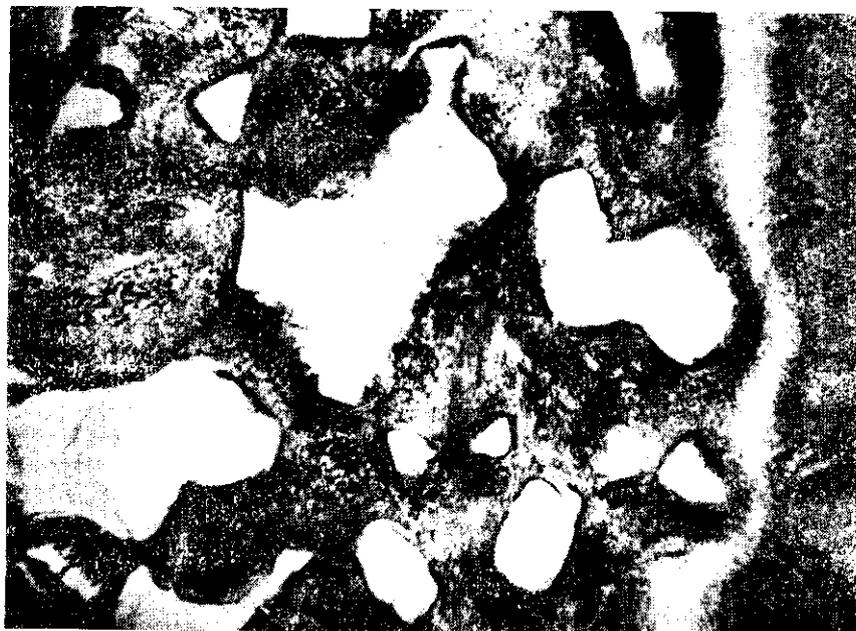


Рис. 1. Грануляционная ткань, замещающая полимерный имплантат через 2 месяца после операции. Гематоксилин-эозин. $\times 50$

Fig. 1. Granulation tissue substituting the implant, 60 days after implantation. Stain H. E. Magn. about $\times 50$. Micrographs.

тканым регенератом (табл. 2). В последнем отмечается большое количество новообразованных сосудов, в просвете которых много моноцитарных элементов.

Через 1 и 2 месяца морфологические особенности тканевой реакции на применение полимерного препарата с 6 %-ным содержанием левамизола становятся еще более заметными. Полимерные композиции замещаются соединительнотканым регенератом почти на 60 % (табл. 2), что значительно выше по сравнению с контролем. Соединительнотканый регенерат по форме соответствует в большинстве случаев порам полимера и представлен в основном молодой соединительной тканью, богатой новообразованными сосудами (рис. 1). Наибольшее количество макрофагальных элементов обнаруживается после двух месяцев исследования (табл. 1). Однако активные макрофаги сосредоточены в основном в центральной части соединительнотканых тяжей (рис. 2). Установлено, что чем крупнее тяжи соединительной ткани, тем крупнее и активнее макрофагальные элементы в них. На данном сроке исследования встречаются участки грануляционной ткани, имеющей более рыхлое строение. Здесь происходит процесс фибролиза соединительнотканых волокон. Помимо активных макрофагов много фибробластических элементов разнообразной формы (звездчатых, веретеновидных). Встречаются зрелые фибробласты, фиброкласты и клетки мезенхимального типа. В контроле к данному сроку исследования отмечается лишь незначительное увеличение количества макрофагальных элементов, которые по размерам и активности значительно уступают опытным (табл. 1).

Начиная с трех месяцев исследования, гистологическая картина меняется в основном в сторону дифференцировки тканевых структур. На

данном сроке исследования тканевый регенерат, замещающий полимерный имплантат, представлен двумя видами ткани. Тяжи, проникающие в имплантат, состоят из фрагментов подкожно-жировой клетчатки, формирующейся в центре соединительнотканых тяжей в виде островков на месте «разжижения» их в результате фиброклазии (рис. 3, а, б). К 6 месяцам происходит почти полное замещение опытного имплантата



Рис. 2. Соединительнотканый тяж с активными макрофагальными элементами. Гематоксилин-эозин. $\times 160$

Fig. 2. Connective tissue fiber containing active macrophage elements. Stain H. E. Magn, about $\times 160$. Micrographs

подкожно-жировой клетчаткой, в контроле полимерный имплантат лишь частично замещен соединительной тканью.

Определение секреторной активности макрофагальных элементов гистохимическими реакциями на кислую фосфатазу показали значительное повышение содержания данного фермента в активированных клетках к двум месяцам исследования по сравнению с контролем (рис. 4, а, б), что свидетельствует о функциональной полноценности данных клеточных элементов.

На основании проведенных исследований можно заключить, что левамизол, иммобилизованный на полимерном носителе, пролонгированно стимулирует малодифференцированные клеточные элементы на всем этапе асептического воспаления. Первоначальная стимуляция моноцитов приводит к ускоренному превращению их в макрофагальные элементы, которые, как известно [13], секретируют в окружающую среду фактор, индуцирующий рост фибробластов и продукцию ими коллагена, о чем можно судить по более быстрому замещению имплантата грануляционной тканью. В дальнейшем дифференцированные макрофаги принимают самое деятельное участие во вторичном моделировании поврежденной ткани. Ремоделирующая функция макрофагов связана с секрецией энзимов, расщепляющих компоненты основного вещества соединительной ткани и ее волокнистые структуры. Таким образом, своевременная активация макрофагов должна растормаживать коллагенолитические функции и усилить резорбцию преформированного колла-

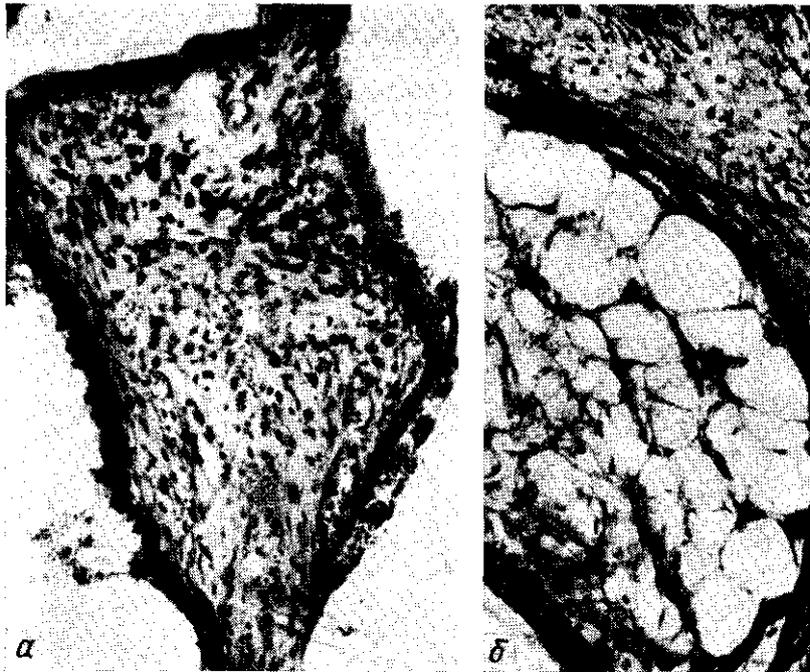


Рис. 3. Инволюция и гистогенез соединительнотканного регенерата: *a* — гоморная реакция в центре соединительнотканного тяжа; *b* — формирование подкожных клетчатки на месте преформированной грануляционной ткани. Гематоксилин-эозин. $\times 160$

Fig. 3. Involution and histogenesis of connective tissue regenerate: *a* — the homor reaction in the connective tissue; *b* — fat tissue formed from granulation tissue. Hematoxylin-Eosin. Magn. about $\times 160$. Micrographs

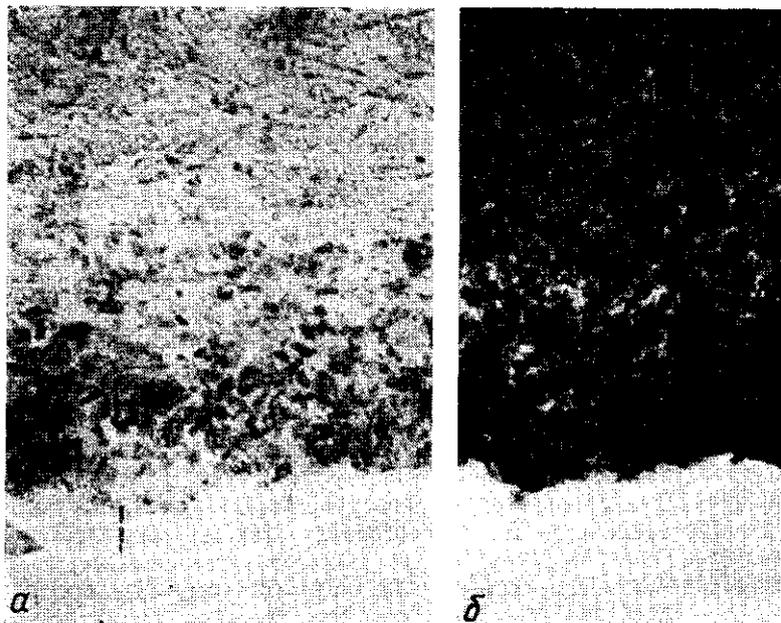


Рис. 4. Активность кислой фосфатазы в соединительнотканном регенерате сычуга после имплантации: *a* — в контроле; *b* — в опыте. Реакция Гомори. $\times 160$

Fig. 4. Acid phosphatase activity in the connective tissue regenerates, two weeks after implantation: *a* — in control; *b* — in experiment. The Gomory reaction. Magn. $\times 160$. Micrographs

гена. Кроме того, происходит ускорение процесса инволюции соединительной ткани за счет перехода клеток фибробластического ряда в фибропласты, выполняющие присущие им функции по резорбции коллагена. И последний этап — это замещение подкожно-жировой клетчаткой места повреждения с помощью стимуляции предшественников жировых клеток, которые, по некоторым данным, относят к малодифференцированным клеткам фибробластического ряда, что и приводит в результате к ускоренной и полной регенерации ткани данного региона [14].

При пластике обширных дефектов черепа полиуретановой композицией, содержащей аутогенную костную стружку и левамизол, происходит постепенное замещение полимерной основы соединительнотканым регенератом с последующей тканевой дифференцировкой в первичную грубоволокнистую кость и восстановлением исходных структур: наружной и внутренней костных пластинок и губчатого вещества кости с элементами кроветворной ткани. Процессы регенерации кости активируются стимуляцией левамизолом малодифференцированных клеточных форм костной ткани, что подтверждается более ранним по сравнению с контролем появлением остеобластических элементов, большим количеством остеобластов и более крупными их размерами. В связи с этим в опыте раньше происходит дифференцировка соединительнотканного регенерата в костную ткань. Остеогенез активируется как со стороны краев костного дефекта, так и из очагов, возникающих на основе аутогенной костной стружки, способствующей формированию костных балок.

Таким образом, изучая процессы стимуляции регенерации двух разновидностей соединительной ткани — рыхлой и костной, построенных по одним принципам, можно сделать заключение о едином механизме этого процесса. Усиление степени дифференцировки клеточных элементов этих тканей приводит к ускоренному выполнению ими главной функции — синтезу фибриллярных и нефибриллярных биополимеров межклеточного матрикса.

В заключение можно сделать вывод о том, что пролонгированный иммуномодуляторный эффект левамизола при пластике дефектов соединительной ткани приводит к усилению степени дифференцировки малодифференцированных клеточных элементов на всем этапе асептического воспаления и тем самым к ускорению процессов регенерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шварцберг И. Н. Нормализация опухолевых клеток.— Л.: Наука, 1987.—141 с.
2. Voiron M. La reversion des cellules cancéreuses // *Pathol.-biol.*—1982.—30, N 3.— P. 113—135.
3. Вядро М. М. Индукторы реверсии опухолевых клеток // *Успехи соврем. биологии.*—1983.—95, № 1.— С. 118—129.
4. Яковсон Г. С., Вакули Г. М. Некоторые клеточные механизмы формирования процессов восстановления поврежденных органов и способы их стимуляции // *Бюл. Сиб. отделения АМН СССР.*—1986.— № 3.— С. 72—74.
5. Шехтер А. Б., Берченко Г. Н., Николаев Л. В. Грануляционная ткань: воспаление и регенерация // *Архив патологии.*—1984.—46, № 2.— С. 20—29.
6. Курцева С. Г., Селицкая Р. П. О терапевтическом патоморфозе. Влияние иммуностимулятора левамизола на морфологию специфического воспаления в эксперименте // *Там же.*—1982.—44, № 11.— С. 38—43.
7. Al-Ibrahim Mochamed S. *In vitro* effect of levamisole on human mononuclear phagocytes of neoplasia by adjuvant therapy // *Immune modulation and control of neoplasia by adjuvant therapy.*—New York, 1978.— P. 39—47.
8. Шехтер А. Б., Каневская М. З., Крель А. А. Влияние левамизола (декариса) на морфологические проявления ревматоидного синовита // *Ревматология.*—1983.— № 3.— С. 16—23.
9. Липатова Т. Э., Пхакадзе Г. А. Полимеры в эндопротезировании.— Киев: Наук. думка, 1983.—157 с.
10. Слущкий Л. И. Новое в исследованиях супрамолекулярной архитектоники и функций соединительной ткани // *Фармакол. регуляция регенератор. процессов в эксперименте и клинике.*— Йошкар-Ола: Изд-во мед. ин-та, 1981.— С. 18—42.
11. Фрейдлин И. С. Система мононуклеарных фагоцитов.— М.: Медицина, 1984.—171 с.
12. Шехтер А. Б., Берченко Г. Н. Фибробластин и развитие соединительной ткани: ультраструктурные аспекты биосинтеза, фиброгенеза и катаболизма коллагена // *Архив патологии.*—1978.— № 8.— С. 70—80.

13. *Маянский Д. Н.* Роль макрофагов в репаративных процессах // *Механизмы патол. реакций.*— Томск : Изд-во Томск. ун-та, 1981.— С. 56—62.
14. *Серов В. В., Шехтер А. Б.* Соединительная ткань.— М. : Медицина, 1984.—171 с.

Ин-т орг. химии АН УССР, Киев

Получено 04.07.88

THE POSSIBILITY OF THE TISSUE REGENERATION INTENSIFICATION
BY AN INCREASE IN THE DIFFERENTIATION DEGREE OF CELL ELEMENTS
AND CONDITIONS OF TISSUE DEFECT

M. A. Galatenko, G. A. Pkhakadze, E. S. Savitskaya, N. N. Bufius

Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Polymeric levamisole-containing drug of the prolonged action has been studied for its effect on regeneration processes of two types of connective tissues. It is shown possible to accelerate the regeneration processes by an increase in the cell differentiation in the place of implantations.

УДК 576.813.12:577.23

Д. Ю. Блохин, В. А. Стручков

**К ВОПРОСУ О НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
НУКЛЕОИДОВ ЭУКАРИОТ**

Свойства нуклеоидов, выделенных из клеток лейкоза L1210 мышей, исследовали методами капиллярной эластовискозиметрии и седиментации. Изучалось действие на нуклеоиды тиолов (2-меркаптоэтанола, дитиотреитола), проназы Р, РНКазы А, этанола, трихлорацетата натрия, нагревания до 60 и 95°C. Показано, что повреждение каркаса нуклеоидов тиолами и проназой вызывает декомпактизацию комплекса без потери доменами ДНК суперспиральной конформации. Декомпактизация структуры комплекса наблюдается также в том случае, если выделенные нуклеоиды подвергаются действию РНКазы А в среде с низкой ионной силой; в других вариантах ферментных обработок декомпактизирующего действия РНКазы А на нуклеоид не обнаружено.

Показано, что нагревание препаратов нуклеоидов до температуры плавления двойной спирали ДНК приводит к полной релаксации суперспиральных доменов и деградации комплекса.

Введение. Проблеме суперспирально-доменной организации хроматина эукариот и функционального значения явления суперспирализации ДНК посвящен ряд обзоров последних лет [1—3]. В настоящее время доказано наличие в геноме эукариотической клетки относительно обособленных областей — петлевых доменов ДНК,— прикрепленных к элементам ядерного скелета (фибрилярно-гранулярной сети интерфазного ядра и фиброному слою ядерной стенки — «ламине») [1—4].

Удобным объектом для исследования данного уровня организации клеточного ядра являются нуклеоиды — остаточные ядерные структуры, состоящие из всей ядерной ДНК, белкового ядерного матрикса, фиброзной «ламина» и небольших количеств РНК, липидов и полисахаридов [1, 5, 6]. Нуклеоиды получают при обработке изолированных ядер или целых клеток неионными детергентами и концентрированными растворами солей, что приводит к последовательной сольubilизации мембран и экстракции большинства растворимых белков [7, 8]. Если процедура лизиса предусматривает подавление эндогенной нуклеазной и протеолитической активности, то полученные нуклеоиды, как правило, содержат суперспиральную ДНК в виде сверхскрученных петель (доменов) [1, 8—10].