

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ • ORIGINAL ARTICLES

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ  
СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ  
ИШЕМИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА: РОЛЬ АНГИОГЕНЕЗАКокорин В.В.\*<sup>1,2</sup>, Крайнюков П.Е.<sup>2,3</sup>

DOI: 10.25881/20728255\_2023\_18\_2\_21

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова», Москва<sup>2</sup> ФКУ «Центральный военный клинический госпиталь им. П.В. Мандрыка», Москва<sup>3</sup> ФGAOY BO «Российский университет дружбы народов», Москва

**Резюме.** Представлены результаты экспериментального исследования хронической хирургической патологии соединительной ткани на примере периартикулярных структур. Изменения, протекающие в соединительной ткани при хроническом воспалении и сопровождающиеся ее длительной ишемией, смоделированы и исследованы *in vivo*. Стимуляция неоангиогенеза проводилась путем активации проангиогенных факторов с использованием локальной интеграции меченных мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (ММСК).

Цель. Изучить влияние интегрированных мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток при хронической хирургической патологии ишемического генеза на процесс регенерации соединительной ткани *in vivo*.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 30 крысах-самцах стока Вистар массой 200–300 г, распределенных по 15 особей на 2 исследуемые группы: основную (n = 15) и контрольную (n = 15). Всем особям выполнено оперативное моделирование острого механического пяточного энтезита, как аналога изменений, протекающих в тканях, в условиях ишемии. В основной группе имплантировали меченные мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, а в группе контроля процесс заживления протекал естественным путем.

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки выделяли на основе интраабдоминального висцерального жира из стромально-васкулярной фракции. Пересаженная культура клеток помечалась путем трансфекции конструкции с зеленым флуоресцирующим белком (GFP) в лентивирусном векторе.

Вывод животных из эксперимента и морфологическое исследование тканей (морфометрическое, гистологическое, иммуногистохимическое) выполняли на 1-е, 15-е, 30-е и 60-е сутки.

Результаты. Морфологически значимые изменения отмечены к 30 суткам. В контрольной группе сохранялись зоны избыточного разрастания грануляционной ткани, богатой кровеносными сосудами, резорбируемые структуры костной ткани, участки формирования реактивного остеогенеза.

В опытной группе данные проявления регрессировали, интеграция меченой клеточной культуры мезенхимальных стволовых клеток в зону дефекта прошла успешно, что отмечено более активными признаками регенерации области повреждения; сформировавшейся, в значительно большем объеме, устойчивой сетью кровеносных сосудов в толще соединительнотканых структур регенерата; мощными строго упорядоченными пучками коллагеновых сухожильных волокон, без признаков отека.

Полное восстановление структур в обеих группах наблюдалось к 60 суткам.

При этом в опытной группе, отличительной особенностью явились множественные группы новообразовавшихся полнокровных кровеносных сосудов разного калибра, пронизывающих фиброзный регенерат в непосредственной близости к зоне «прилива» — терминальной зоне минерализованного и неминерализованного участков фиброзной хрящевой ткани, без признаков воспалительной реакции.

ANGIOGENESIS ROLE IN THE REGULATION STRUCTURAL  
CHANGES OF CONNECTIVE TISSUE IN CHRONIC SURGICAL  
PATHOLOGY ISCHEMIC GENESISKokorin V.V.\*<sup>1,2</sup>, Kraynyukov P.E.<sup>2,3</sup><sup>1</sup> Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow<sup>2</sup> P.V. Mandryka Central Military Clinical Hospital, Moscow<sup>3</sup> RUDN University, Moscow

**Abstract.** The results of an experimental study of chronic surgical pathology of connective tissue on the example of periarticular structures are presented. The changes occurring in connective tissue during chronic inflammation and accompanied by its prolonged ischemia were modeled and studied *in vivo*. Neoangiogenesis was stimulated by activating proangiogenic factors using local integration of labeled mesenchymal multipotent stem cells (MMSCs).

Purpose. To study the effect of integrated mesenchymal multipotent stem cells in chronic surgical pathology of ischemic genesis on the process of connective tissue regeneration *in vivo*.

Materials and methods. The experiment was performed on 30 male Wistar stock rats weighing 200–300 g, distributed in 15 individuals into 2 study groups: the main (n = 15) and control (n = 15). All individuals underwent operative modeling of acute mechanical calcaneal enthesitis, as an analogue of changes occurring in tissues under conditions of ischemia. Labeled multipotent mesenchymal stem cells were implanted in the main group, and the healing process proceeded naturally in the control group.

Multipotent mesenchymal stem cells were isolated on the basis of intraabdominal visceral fat from the stromal-vascular fraction. The transplanted cell culture was labeled by transfection of a construct with a green fluorescent protein (GFP) in a lentiviral vector.

Withdrawal of animals from the experiment and morphological examination of tissues (morphometric, histological, immunohistochemical) were performed on the 1st, 15th, 30th and 60th days.

Results. Morphologically significant changes were noted by 30 days. In the control group, areas of excessive growth of granulation tissue rich in blood vessels, resorbable bone structures, and areas of formation of reactive osteogenesis were preserved.

In the experimental group, these manifestations regressed, the integration of the labeled cell culture of mesenchymal stem cells into the defect zone was successful, which was marked by more active signs of regeneration of the injury area; a stable network of blood vessels formed in a much larger volume in the thickness of the connective tissue structures of the regenerate; powerful strictly ordered bundles of collagen tendon fibers, without signs of edema.

Complete restoration of structures in both groups was observed by 60 days.

At the same time, in the experimental group, a distinctive feature were multiple groups of newly formed full-blooded blood vessels of different calibers penetrating the fibrous regenerate in close proximity to the “tide” zone - the terminal zone of mineralized and non-mineralized sections of fibrous cartilage tissue, without signs of an inflammatory reaction.

\* e-mail: kokorinvv@yandex.ru

**Заключение.** Ангиогенный эффект в ишемизированных тканях при применении генно-клеточных конструкций реализуется посредством ещё не до конца изученных механизмов. Однако, эффективность этого подхода доказана в ходе проведенных исследований и позволяет рассматривать его как безопасный инструмент в комплексном лечении хирургических заболеваний, одним из факторов патогенеза которых является ишемия.

Проведенное исследование дает право утверждать, что непосредственное участие интегрированных меченных ММСК с фибро- и хондрогенным потенциалом играет исключительную роль в дифференцировке фиброцитов (тендиноцитов) и хондроцитов, оказывает мощное влияние на процесс регенерации *in vivo* и сопровождается неоангиогенным эффектом не только в условиях искусственного культивирования.

Остается нерешенной проблема управления дифференцировкой клеток, их механическими, физическими, химическими триггерами в программировании сложного механизма регуляции.

Правильный выбор источника клеток и метода их имплантации играет важную роль в процессах ангиогенеза и репарации.

**Ключевые слова:** энтез, энтезопатия, неоангиогенез, регенерация, эксперимент, периартикулярная соединительная ткань, биоинженерия, омикс, клеточные технологии.

## Введение

На сегодняшний день все большее количество современных исследователей обращает свое внимание и отдает предпочтение таким направлениям в медицине, как биоинженерия и генно-клеточные технологии, отводя в ближайшем будущем им первостепенную и, несомненно, ведущую роль в лечении различных заболеваний. Одной из самых сложных задач в тканевой инженерии является не только неоваскуляризация, без которой питательные вещества, необходимые для регенерации, не доставляются к тканям-мишеням, но и формирование достаточной плотности, стабильного функционирующего сосудистого русла, необходимого для снижения гибели клеток, обеспечивающего поступление питательных и защитных факторов в течение длительного времени.

Проанализировав полученные в ходе экспериментального исследования данные, удалось рассмотреть одну из сложных сторон в патогенезе хронического течения заболеваний соединительной ткани.

Выделяют более 70 нозологических форм, причиной которых служит нарушение образования сосудов [1]. Со сниженной васкуляризацией связывают остеопороз, язвенную болезнь желудка, невынашивание плода, в то время как с избыточной — псориаз, диабетическую ретинопатию, ревматоидный артрит [2].

Формирование сосудистой сети имеет первостепенное значение в развитии и прогрессировании солидных опухолей. При недостаточном кровоснабжении первичная неоплазма может достичь всего 1–2 мм в диаметре, а дальнейший рост начинается только после образования собственных кровеносных сосудов [3].

Коррекция нарушений регионарного кровообращения в этиопатогенетическом лечении хирургических заболеваний занимает ключевую роль в современной медицине.

Ткани организма, которые в процессе филогенетического развития исходно сформировались, имея недостаточную васкуляризацию, отсутствующий магистральный

**Conclusion.** The angiogenic effect in ischemic tissues with the use of gene-cell constructs is realized through mechanisms that have not yet been fully studied. However, the effectiveness of this approach has been proven in the course of research and allows us to consider it as a safe tool in the complex treatment of surgical diseases, one of the pathogenesis factors of which is ischemia.

The conducted study gives the right to assert that the direct participation of integrated labeled MMSCs with fibro- and chondrogenic potential plays an exceptional role in the differentiation of fibrocytes (tendinocytes) and chondrocytes, has a powerful effect on the regeneration process *in vivo* and is accompanied by a neoangiogenic effect not only in artificial cultivation.

The problem of controlling cell differentiation, their mechanical, physical, and chemical triggers in programming a complex regulatory mechanism remains unresolved.

The correct choice of the source of cells and the method of their implantation plays an important role in the processes of angiogenesis and repair.

**Keywords:** enthesitis, enthesopathy, neoangiogenesis, regeneration, experiment, periarticular, connective tissue, bioengineering, omics, cellular technologies.

кровоток, в первую очередь подвержены повреждениям. Однако существуют изменения, возникшие в тканях, в результате воздействия агрессивных факторов (воспаления, травмы, инфекции, аутоиммунных, генетических аберраций), приводящих к нарушению кровообращения, восстановить которое, на сегодняшний день, традиционными методами ангиохирургии не представляется возможным.

Ранее технологии лечения «неподдающихся пониманию» заболеваний осуществлялись в основном по пути донорства тканей и органов. Вместе с тем, множество проблем, связанных с этим разделом медицины — поиск подходящего донора (возраст, пол, географические данные, группа крови, иммунный ответ, токсичность органов и др.), длительность послеоперационного приема иммуносупрессивных препаратов и реабилитации, ограниченный доступ групп населения к данному пулу отчасти закрытых технологий и многое другое — также не позволяют считать этот метод перспективным [4].

По ряду указанных причин, все больше привлекают внимание достижения биоинженерии и генно-клеточных технологий, обладающие высоким потенциалом к регенерации и ауторепарации, которые на современном уровне технологического развития, невозможны без неоангиогенеза.

**Цель.** Изучить влияние интегрированных мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток при хронической хирургической патологии ишемического генеза на процесс регенерации соединительной ткани *in vivo*.

## Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 30 крысах-самцах стока Вистар (питомник «Рапполово», г. Санкт-Петербург), масса которых составляла 200–300 г; всех особей поровну разделили на 2 исследуемые группы, получившие название «основная» (n = 15) и, соответственно, «контрольная» (n = 15). Содержание и работу с лабораторными животными осуществляли в соответствии с требованиями

приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23.08.2010 г. №708н «Об утверждении правил лабораторной практики»: животные находились в отдельных клетках со свободным доступом к воде и корму, при стандартном суточном режиме освещения.

Грызунам было выполнено моделирование острого механического пяточного энтезита; данное вмешательство осуществлялось в операционной, с применением наркоза и соблюдением правил асептики и антисептики. В основной группе имплантировали меченные мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, а в группе контроля процесс заживления протекал естественным путем. Выведение животного из эксперимента осуществляли путем летальной дозы наркоза (Золетил 100, Virbac). В целях объективизации полученных результатов было проведено:

**Морфометрическое исследование.** Изучали микрофотографии 30 продольных срезов пяточных костей, фотографируя всю их площадь при увеличении 100 (объектив HC PL FLUOTAR 10×/0,30 PH1, площадь фотографии 2048×1536 пикселей), после чего каждому полученному изображению присваивали свой порядковый номер; затем формировали серию: 10 микрофотографий на каждый препарат. Оценивали частоту встречаемости новообразовавшихся кровеносных сосудов в полях зрения (в шт.) исследуемого энтезоорганоконструкса. Анализ результатов проводили по трем временным точкам: 15-е, 30-е, 60-е сутки после проведения операции с помощью программы Excel программного пакета Microsoft Office 2010.

**Иммуногистохимическое исследование.** Маркерный белок в костно-хрящевых регенератах выявляли при помощи моноклональных антител к GFP (Green Fluorescents Protein) — ab290 (Abcam). Для детекции продукта реакции применяли методику EnVision™/HRP (Dako) с соответствующим набором реактивов. Затем, гистологические срезы декальцинированных образцов подвергали демаскировке антигенов высокотемпературной обработкой в цитратном буфере. После чего выполняли визуализацию продуктов реакции с первичными антителами при помощи реагентов DAB-kit (Dako), происходило цитоплазматическое окрашивание коричневым цветом. Анализ данных выполнен на персональном компьютере с использованием приложения Microsoft Excel и пакета статистического анализа данных Statistica 10 for Windows (StatSoft Inc.). Оценку различия между группами производили при помощи критерия Манна Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

Через 3 суток культивирования выделенных клеток с введенной в культуральную систему плазмидой, при изучении во флюоресцентном микроскопе, в культуре определялись фибробластоподобные клетки, обладающие флюоресценцией в количестве до 30% (Рис. 1). Клетки имели морфологию, соответствующую исходной куль-

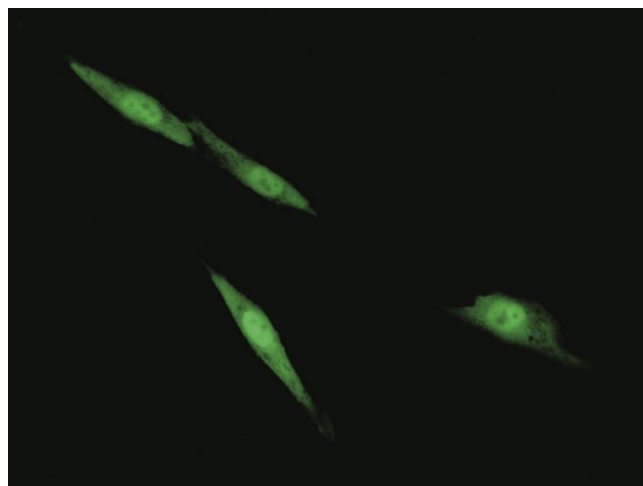


Рис. 1. Культура ММСК крысы, флюоресценция GFP+ клеток. Флюоресцентная микроскопия ×250.

туре, и состояли из полигональных, малоотростчатых, веретенновидных клеток.

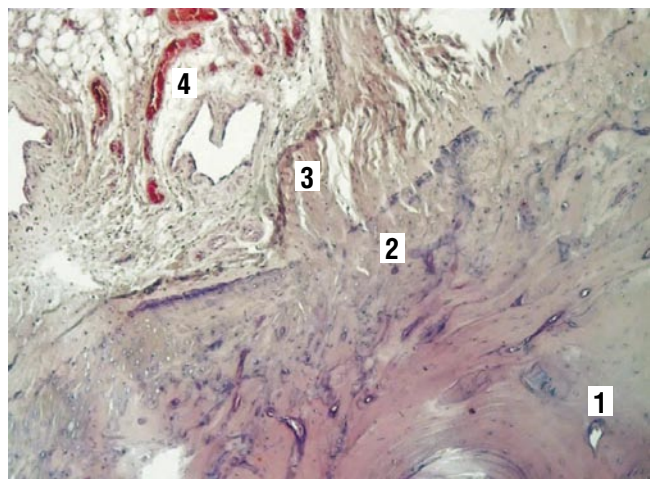
Модель механической энтезопатии подтверждалась исследованием, проведенным через 1 сутки после оперативного повреждения энтезоорганоконструкса.

Морфологически определены характерные для механического повреждения энтезоорганоконструкса признаки: разволокнение фибриллярных структур плотной волокнистой соединительной ткани — следы перенесенной операции, что непосредственно подтверждало механический фактор воздействия.

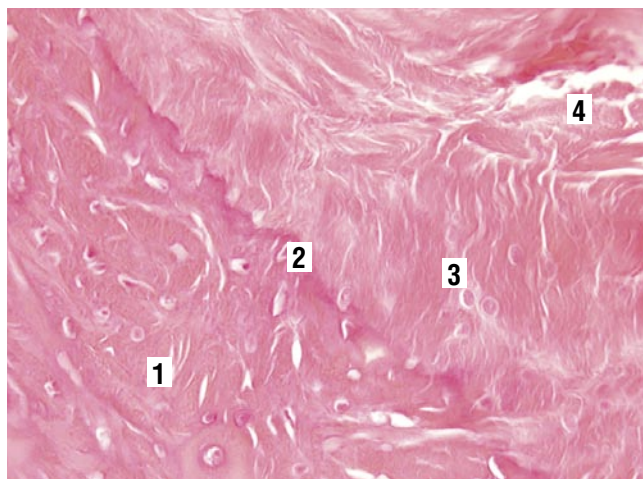
Разволокненные мощные пучки коллагеновых волокон доходили до области т.н. «границы прилива» — терминальной зоны минерализованного и неминерализованного участков фиброзной хрящевой ткани. Изменения структур костной ткани, лейкоцитарная инфильтрация не были обнаружены. Клеточные проявления воспалительного процесса не были выявлены. Вместе с тем, сосуды связки были полнокровны; в мелких сосудах наблюдался сладж эритроцитов. Принципиальных различий в обнаруженных изменениях на 1-е сутки в различных топографических зонах — конечности плечевого или тазового поясов — не было выявлено. Ни в одном из случаев реакция со стороны лейкоцитов не выявлена, что свидетельствовало о весьма умеренном повреждении и стерильности выполненных манипуляций.

Следует подчеркнуть, что коллагеновые волокна вплетающегося сухожилия характеризовались более мощным развитием и меньшей клеточностью (Рис. 2–4).

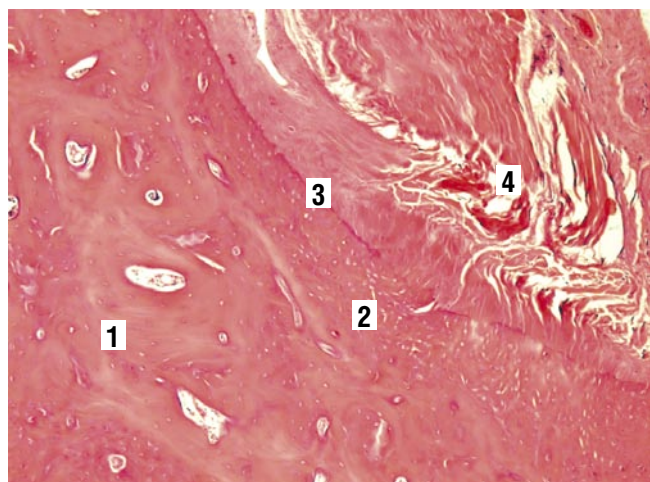
**На 15-е сутки после механического повреждения** и в контрольной, и в основной группах область повреждения была трудно различима. Связочный аппарат был представлен плотной оформленной волокнистой соединительной тканью, признаки воспалительной инфильтрации не обнаруживались. Определялись участки реактивных изменений соединительной ткани, которые характеризовались наличием сосудистой реакции — умеренным ангиогенезом, появ-



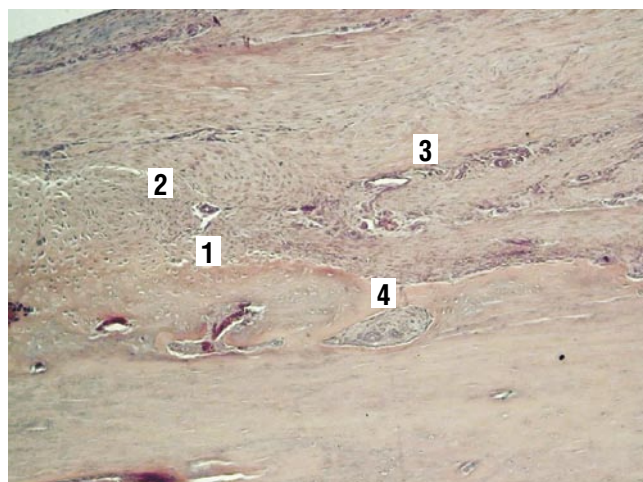
**Рис. 2.** Область прикрепления сухожильной связки (локтевая область) через 1 сутки после моделирования повреждения: пластинчатая костная ткань (1); участки фиброзной хрящевой ткани — «граница прилива» (2); волокнистая соединительная ткань вплетающегося сухожилия (3), пронизанная группой полнокровных кровеносных сосудов (4). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.:  $\times 100$ .



**Рис. 4.** Область прикрепления сухожильной связки (правая пяточная кость) через 1 сутки после повреждения: фиброзная хрящевая ткань (1) с участками пластинчатой костной ткани (\*); граница минерализации (2); плотная оформленная волокнистая соединительная ткань (3); зона перенесённой операции (4). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.:  $\times 200$ .



**Рис. 3.** Область прикрепления сухожильной связки (левая пяточная кость), 1-е сутки после операции: пластинчатая костная ткань (1); ретикулофиброзная костная ткань (2); фиброзная хрящевая ткань (3); область максимального повреждения в зоне травмы (4). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.:  $\times 100$ .



**Рис. 5.** Область прикрепления сухожильной связки (левая пяточная кость) через 15 суток после повреждения: фиброзная хрящевая ткань (1); новообразованный костно-хрящевой экзостоз (2); полнокровные кровеносные сосуды (3); расширенный канал первичного остеона, заполненный реактивно-изменённой соединительной тканью (4). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.:  $\times 100$ .

лением полнокровных кровеносных сосудов и реактивным остеогенезом с расширением остеонных структур в проекции повреждения. В последних находках следует отметить, что расширенные внутренние пространства гаверсовых каналов содержали толстостенные кровеносные сосуды и богатую фибробластами ткань (Рис. 5). У животных основной группы к 15-м суткам от начала эксперимента констатировались те же гистологические процессы, что и в контрольной группе, что служило подтверждением принципиального единства закономерностей посттравматического регенерационного гистогенеза.

Однако, выраженность их существенно различалась: не были выявлены зоны избыточного разрастания гра-

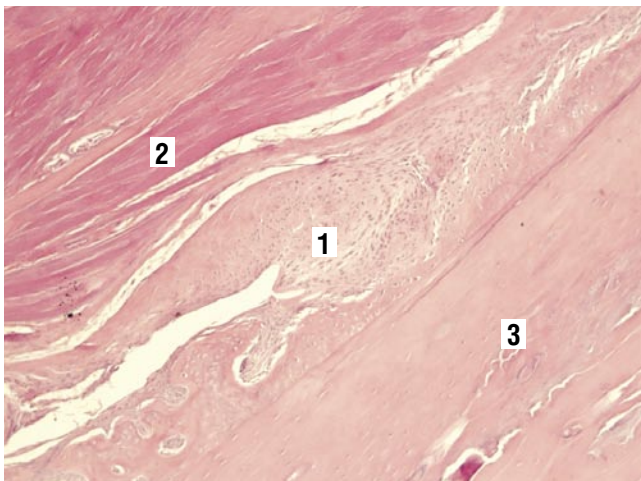
нуляционной ткани, богатой кровеносными сосудами и участки формирования реактивного остеогенеза. Мощные пучки коллагеновых волокон сухожилия были строго упорядочены, признаки отёка не определялись. Новообразованный матрикс формировал структуру фиброзно-хрящевого регенерата, а резорбируемые структуры костной ткани отсутствовали (Рис. 6). Особый интерес представляла трансформация имплантированных меченных клеток. При окрашивании гематоксилином и эозином эти клетки визуализировать не представлялось возможным. Их морфология, а также кластеры расположения не позволяли определить их в ландшафте регенерата. Выявить введённые клетки позволил иммуногистохимический

поиск GFP. Как правило, констатировалась мозаичная картина с чередованием меченных и немеченных клеток. Первые нередко располагались в ткани небольшими группами, что позволяло предполагать или их совместное попадание в данный тканевый компартмент, или некоторую пролиферацию после переноса из условий *in vitro* в условия посттравматической регенерации.

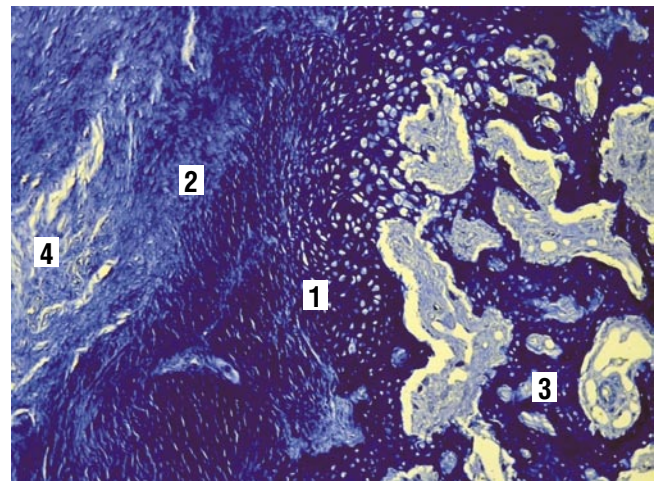
Наличие между мечеными клетками матрикса позволяло утверждать о продуктивном участии в регенерации, т.е. синтезе специфических для хрящевой ткани хондроцитов (Рис. 7). К 30-м суткам у контрольной группы в зоне, соответствующей области повреждения, связочный аппарат был представлен плотной оформленной волокнистой соединительной тканью с участками разволокнения фибриллярных структур и

большим количеством фибробластов. Локально выявлялись участки регенерации, визуализирующиеся как соединительная ткань рыхлого строения. В области, располагающейся вблизи энтезиса, определялись участки пластинчатой костной ткани с полнокровными кровеносными сосудами, локализующимися в гаверсовых каналах.

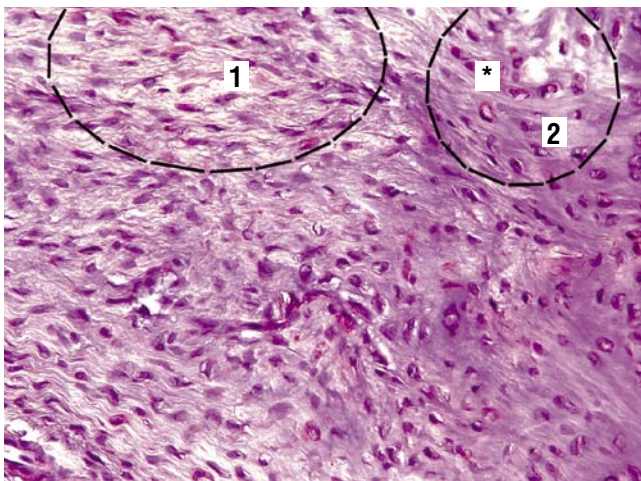
Признаков воспалительной инфильтрации не было обнаружено. Как и в группе контроля, у животных опытной группы к 30-м суткам область повреждения была представлена фиброзным регенератом. Однако, упорядоченность коллагеновых волокон и их строение давали основания предполагать, что регенерация в области повреждения, при внесении в зону дефекта культуры ММСК, протекала более активно (Рис. 8–10).



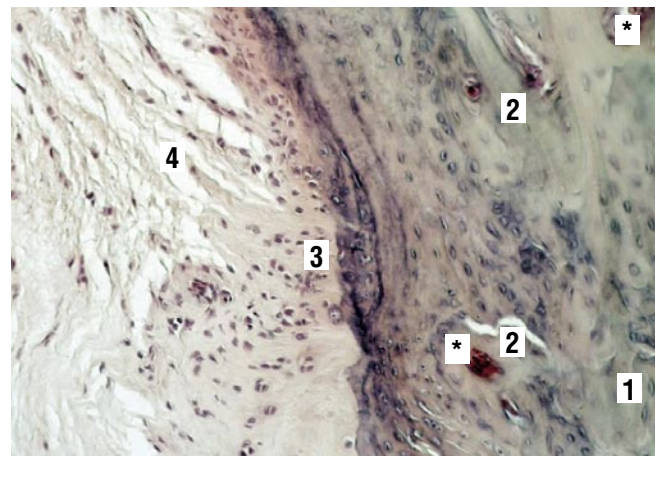
**Рис. 6.** Область прикрепления сухожильной связки (правая пяточная кость) через 15 суток после повреждения: фиброзная хрящевая ткань (1); плотная оформленная волокнистая соединительная ткань (2); пластинчатая костная ткань (3). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.:  $\times 100$ .



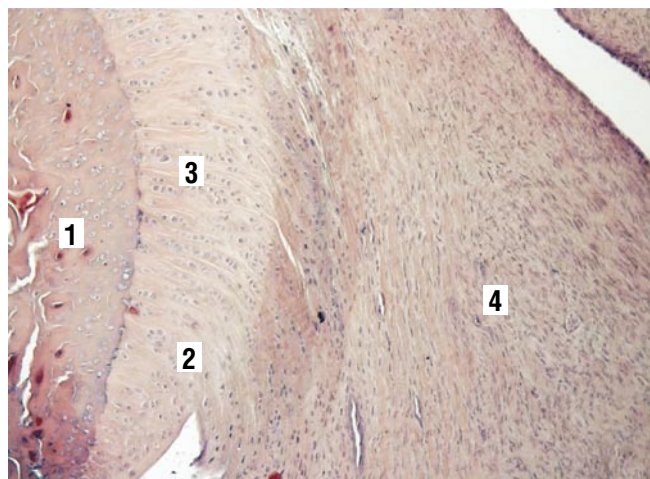
**Рис. 8.** Структура регенерата в зоне повреждения (левая пяточная кость) через 30 суток после повреждения: фиброзная хрящевая ткань (1); плотная оформленная волокнистая соединительная ткань (2); ретикулофиброзная костная ткань (3); область регенерации (4). Окраска: трихром по Маллори. Ув.:  $\times 100$ .



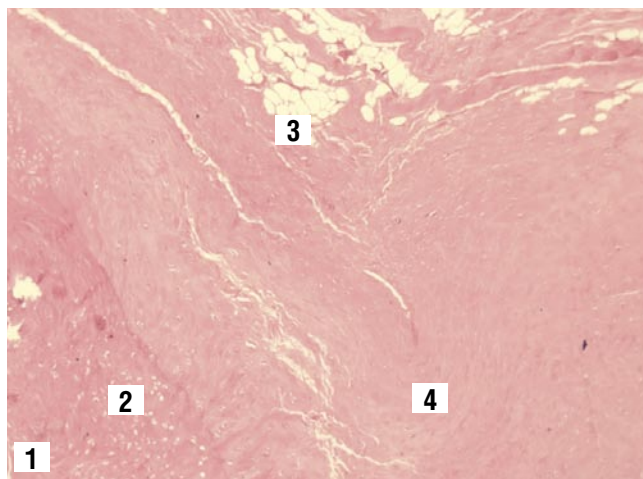
**Рис. 7.** Область регенерации через 15 суток у животного опытной группы: GFP+ клетки в волокнистой соединительной ткани (1); группа GFP+ хондроцитов (2 и \*). ИГХ-реакция с антителами к GFP, докраска гематоксилином. Ув.:  $\times 200$ .



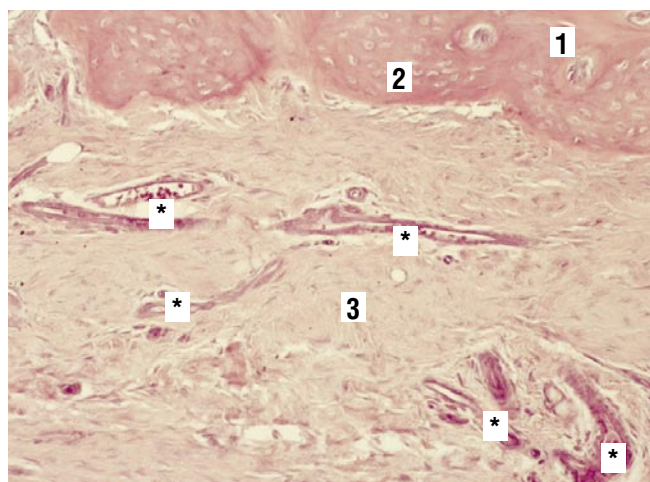
**Рис. 9.** Область энтезиса (правая пяточная кость) через 30 суток после операции: костная ткань (1); гаверсовы системы (2) с полнокровными кровеносными сосудами (\*); фиброзная хрящевая ткань (3); плотная соединительная ткань с разволокненными фибриллами (4). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.:  $\times 200$ .



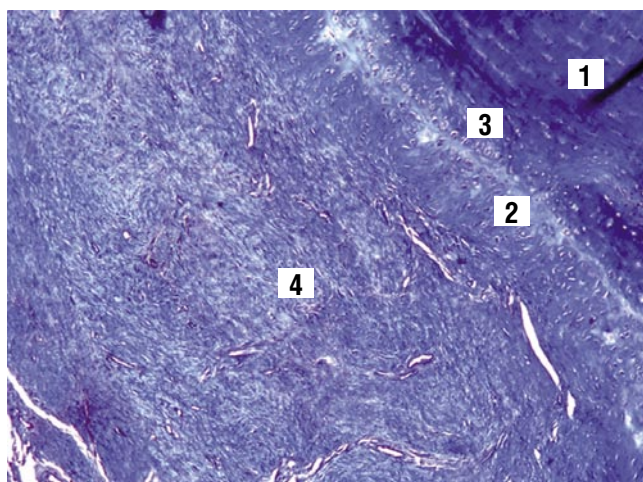
**Рис. 10.** Область прикрепления сухожильной связки (левая пяточная кость) через 30 суток после повреждения: костная ткань (1); хрящевая ткань (2); хондроцитарные пролифераты — «монетные столбики» (3); плотная оформленная соединительная ткань (4). Окраска: гематоксилин и зозин. Ув.:  $\times 100$ .



**Рис. 12.** Область энтезиса (левая пяточная кость), 60 суток после операции: костная ткань смешанного строения (1); хрящевая ткань с неупорядоченными хондроцитами (2); жировая ткань (3); плотная соединительная ткань с плотноупакованными коллагеновыми волокнами (4). Окраска: гематоксилин и зозин. Ув.:  $\times 100$ .



**Рис. 11.** Зона обильного неоангиогенеза (правая пяточная кость) в зоне повреждения через 30 суток: пластинчатая костная ткань (1); фиброзная хрящевая ткань (2); плотная волокнистая соединительная ткань (3), пронизанная новообразованными кровеносными сосудами (\*). Окраска: гематоксилин и зозин. Ув.:  $\times 200$ .



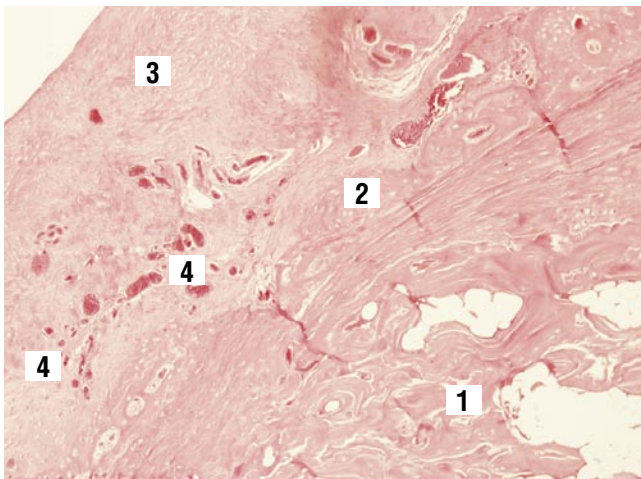
**Рис. 13.** Структура сухожильной связки (правая пяточная кость) через 60 сут. после нанесения повреждения: костная ткань (1); зона минерализации (2); фиброзная хрящевая ткань (3); плотная соединительная ткань с упорядоченными волокнами коллагена (4). Окраска: трихром по Маллори. Ув.:  $\times 100$ .

Помимо этого, привлекали внимание группы кровеносных сосудов, сформировавшихся в толще соединительнотканых структур регенерата в значительно большем объеме, чем в группе контроля (Рис. 11).

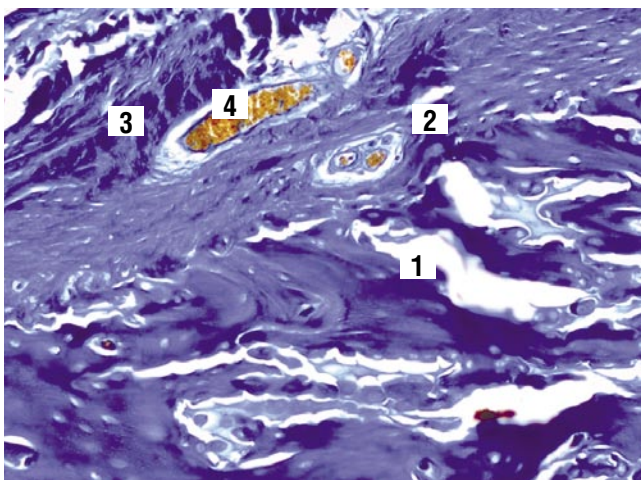
К 60-м суткам в контрольной группе зона ранее перенесенной операции в области энтезиса не обнаруживалась: структура связки была представлена волокнистой соединительной тканью с плотной упаковкой коллагеновых волокон, редкими участками жировой ткани. Костно-хрящевые участки регенерата имели типовое последовательное строение — пяточная кость была покрыта хрящевой тканью, в структуру которой были вплетены волокна сухожильной связки. Признаки воспалительной реакции не были выявлены (Рис. 12, 13).

В опытной группе к 60-м суткам строение регенерата в области нанесения повреждения было аналогичным контрольной группе: плотные коллагеновые пучки волокнистой оформленной соединительной ткани были прочно вплетены в структуру фиброзного хряща, покрывающего поверхность пяточной кости непосредственно в области энтезиса. Костный компонент имел, преимущественно, пластинчатый тип, в интра trabecularном пространстве располагались участки жировой ткани и костного мозга.

Отличительной особенностью, привлекающей внимание в опытной группе, являлись множественные группы новообразовавшихся полнокровных кровеносных сосудов разного калибра, пронизывающих фиброзный



**Рис. 14.** Область энтезиса правой пяточной кости с зонами обильного неангиогенеза, 60 сут. после операции: костная ткань пластинчатого типа (1); фиброзная хрящевая ткань (2); плотная волокнистая соединительная ткань (3), пронизанная группами кровеносных сосудов разного калибра (4). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.:  $\times 100$ .

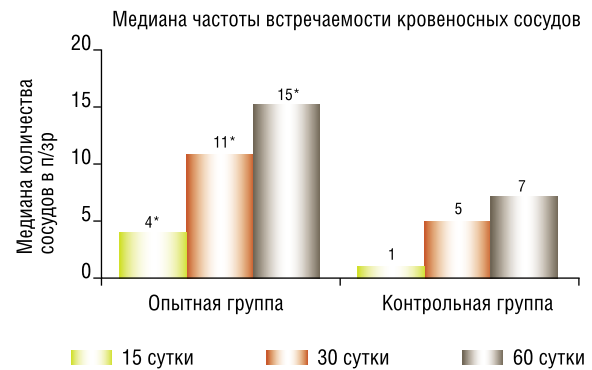


**Рис. 15.** Область прикрепления сухожильной связки (левая пяточная кость), 60 сут. после операции: пластинчатая костная ткань (1); фиброзная хрящевая ткань (2); плотная волокнистая соединительная ткань (3); полнокровные кровеносные сосуды (4). Окраска: трихром по Маллори. Ув.:  $\times 100$ .

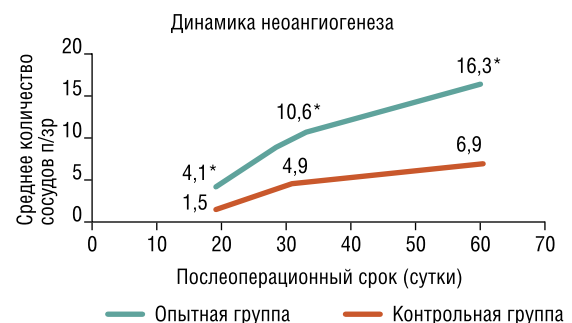
регенерат в непосредственной близости к зоне «прилива» — терминальной зоне минерализованного и неминерализованного участков фиброзной хрящевой ткани. Как и в группе контроля, воспалительная инфильтрация не была обнаружена (Рис. 14, 15).

### Выводы

Таким образом, проведенный эксперимент позволил установить принципиально важный факт — непосредственное участие пересаженных клеток с фибро- и хондрогенным дифференцировочным потенциалом в репаративном процессе, в том числе путем дифференцировки в фиброциты (тендиноциты) и хондроциты. Данное обстоятельство дополняет представление о непо-



**Рис. 16.** Результаты гистоморфометрии в зоне моделирования механической энтезопатии. \*Статистически значимые различия — четырехкратное увеличение сосудов в п/зр на 15-е сутки и двукратное на 30-е и 60-е в опытной группе по сравнению с контрольной. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .



**Рис. 17.** Сравнительные показатели ангиогенеза в исследуемой модели энтезопатии при имплантации ММСК и без. На 15-е сутки в основной группе среднее кол-во сосудов в п/зр. составлено 4,1, в контрольной 1,5; на 30-е сутки 10,6 и 4,9; на 60-е сутки 16,3 и 6,9 соответственно. \*Статистически значимые различия. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

средственном участии пересаженных ММСК в процессе регенерации *in vivo*, а не только в искусственных или относительно изолированных культуральных условиях.

Восстановление соединительной ткани было значимым к 30 суткам после проведения операции как в группе контроля, так и в группе с пересаженными ММСК. Визуальные характеристики фиброзного регенерата у животных опытной группы, такие как плотность упаковки коллагеновых волокон, их упорядоченность, кровоснабжение зоны повреждения — подтверждают положительное влияние пересаженных в область нанесенного дефекта культур клеток (Рис. 16).

Результаты гистоморфометрии коррелируют с данными гистологического исследования. Так, количество новообразовавшихся кровеносных сосудов, сгруппированных преимущественно в зоне нанесения дефекта, преобладает в опытных группах, начиная со срока 15 суток. Динамические показатели ангиогенеза также дополняют ранее полученные результаты об эффективности применения пересаженных ММСК в область повреждения для регенерации связочного аппарата (Рис. 17).

## Заключение

Ангиогенный эффект в ишемизированных тканях при применении генно-клеточных конструкций реализуется посредством ещё не до конца изученных механизмов. Стоит отметить, что в ходе проведенных исследований была доказана эффективность данного подхода, что несомненно позволяет рассматривать его как безопасный инструмент в комплексном лечении хирургических заболеваний, одним из факторов патогенеза которых является ишемия.

В связи с развитием ишемизированных участков тканей при хронических хирургических заболеваниях возникает необходимость в стимуляции факторов не-оангиогенеза не только локально, но и системно. Также следует помнить, что ангиогенез должен быть завершен при определенной плотности и в течение соответствующего периода времени, чтобы предотвратить некроз клеток. Неспособность решить эту проблему приводит к ухудшению функциональности ткани по сравнению с нативной, значительно снижая жизнеспособность клеток [5].

Анализ причин ограниченной эффективности стандартных подходов в лечении больных патологией периферических тканей свидетельствует о необходимости подробного изучения этиопатогенетических механизмов с целью совершенствования методов консервативного лечения и хирургических вмешательств с учетом изученных факторов, анатомо-физиологических особенностей, а также с использованием современных достижений регенеративной медицинской биологии [6; 7].

Правильный выбор источника клеток и метода их имплантации играет жизненно важную роль в ангиогене-

зе. Еще одной серьезной проблемой остается управление дифференцировкой клеток, а также понимание необходимых механических и физических стимулов, которые нужно исключительно точно смоделировать [8–10].

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15; 438(7070): 932–6. doi: 10.1038/nature04478. PMID: 16355210.
2. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003; 9: 653–660.
3. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285: 1182–1186.
4. Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClintock A, Laurencin CT. Progress in 3D bioprinting Technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*. 2020; 226: 119536. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119536.
5. Shokrani H, Shokrani A, Sajadi SM, Seidi F, Mashhadzadeh AH, Rabiee N, Saeb MR, Aminabhavi T, Webster TJ. Cell-Seeded Biomaterial Scaffolds: The Urgent Need for Unanswered Accelerated Angiogenesis. *Int J.*
6. Шевченко Ю.Л., Матвеев С.А., Пинаев Г.П. и др. Экспериментальное обоснование возможности имплантации эмбриональных кардиомиоцитов в комплексной терапии миокардиальной слабости // Физиология человека. — 1999. — Т.25. — №4. — С.109–117. [Shevchenko YUL, Matveev SA, Pinaev GP, et al. Eksperimental'noe obosnovanie vozmozhnosti implantacii embrional'nyh kardiomiocitov v kompleksnoj terapii miokardial'noj slabosti. *Fiziologiya cheloveka*. 1999; 25(4): 109–117. (In Russ.)]
7. Шевченко Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. — СПб.: Наука, 2006. — 263 с. [Shevchenko YUL. *Mediko-biologicheskie i fiziologicheskie osnovy kletocnyh tekhnologij v serdechno-sosudistoj hirurгии*. SPb. Nauka, 2006. 263 p. (In Russ.)]
8. *Nanomedicine*. 2022; 17: 1035–1068. doi: 10.2147/IJN.S353062.
9. Gilpin SE, Wagner DE. Acellular human lung scaffolds to model lung disease and tissue regeneration. *Eur Respir Rev*. 2018; 27: 180021.
10. Iravani S, Varma RS. Green synthesis, biomedical and biotechnological applications of carbon and graphene quantum dots. *Environ Chem Lett*. 2020;1-25. doi: 10.1007 / s10311-020-00984-0.