



На правах рукописи

20 АВГ 2009

САХАРОВ АНДРЕЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАСТИНКИ
РОСТА ТЕЛА ПОЗВОНКА МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ОНТОГЕНЕЗЕ**

16.00.02 – патология, онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Саранск 2009

Работа выполнена в ГОУ ВПО Федерального агентства по образованию
«Новосибирский государственный педагогический университет»
г. Новосибирск

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Рябчикова Елена Ивановна
(ФГУН ГНЦВБ «Вектор»,
г. Новосибирск)

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Донкова Наталья Владимировна
(ФГОУ ВПО «КрасГАУ», г. Красноярск)

доктор биологических наук, профессор
Усенко Виктор Иванович
(ФГОУ ВПО КГАВМ им. Н.Э. Баумана,
г. Казань)

доктор биологических наук, профессор
Шубина Ольга Сергеевна
(ГОУ ВПО МГПИ им. М.Е. Евсевьева,
г. Саранск)

Ведущее учреждение: ФГОУ ВПО «Оренбургский государственный
аграрный университет», г. Оренбург

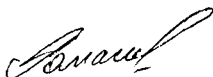
Защита состоится «18» октября 2009 г. 10⁰⁰ часов на заседании
диссертационного Совета ДМ 212.117.15 в ГОУ ВПО Мордовский
государственный университет им. Н.П. Огарёва (430005, Республика
Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, 68.)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Мордовского
государственного университета им. Н.П. Огарёва.

Автореферат диссертации опубликован на официальном сайте ВАК РФ
<http://vak.ed.gov.ru>

Автореферат разослан «6» августа _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Т.А. Романова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Осевой скелет позвоночных всех классов закладывается в принципиально одинаковом виде, и принципиальное сходство его строения сохраняется во взрослом состоянии (Smitt H., 2004; Gilberg G. 2005). Однако развитие каждого из структурных элементов осевого скелета на общем фоне тесной структурной взаимосвязи под влиянием формообразующих факторов и генетического контроля происходит относительно самостоятельно (Cartol F., 2000; Серов О.Л., 2006). Морфогенетические закономерности развития осевого скелета у различных видов млекопитающих, включая человека, изучены недостаточно. В первую очередь это касается хрящевой пластинки роста тела позвонка, функциональная активность клеток которой определяет рост позвоночного столба (Glogieux F.H., 2000; Malemud C.J., 2007). Данные о возрастных особенностях формирования пластинки роста человека и животных необходимы для понимания патогенеза аномалий и пороков развития позвоночного столба, как врожденных, так и возникающих, в постнатальном периоде онтогенеза.

Следует отметить, что актуальность исследования морфогенеза структурных компонентов тела позвонка человека и животных во многом продиктована запросами практической медицины. В настоящее время клеточная и тканевая инженерия находят всё более широкое применение при травматических повреждениях хрящевой ткани (Hu J.C., 2005; Cai D.Z., 2007). Дефицит клеток для пересадки делает настоятельной необходимостью поиска альтернативных источников донорского материала (Подгорный О.В., 2004, Репин В.С., Сухих Г.Т. 2007; Ярыгин В.Н., 2007). Известная близость многих физиологических показателей человека и свиньи открывает новые перспективы для изучения возможности использования клеток и тканей свиньи в клеточных технологиях (Шумаков В.И., 2007, 2008). Очевидно, что технологии трансплантации фетальных клеток должны основываться на современных представлениях о структурно-функциональной организации хрящевой ткани и закономерностях ее развития в онтогенезе. В этой связи исследование морфофункциональных характеристик клеток хондрогенного дифферона пластинки роста человека и свиньи в динамике возрастных изменений представляется актуальной проблемой.

Целью настоящего исследования явилось изучение морфофункциональных взаимоотношений клеток и матрикса пластинки роста тела позвонка человека и свиньи в возрастном аспекте, а также разработка научно обоснованных принципов оптимального выбора клеточного материала для тканевой инженерии.

Задачи исследования:

1. Выявить общие закономерности морфогенеза пластинки роста тела позвонка человека и свиньи в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза.
2. Изучить особенности структурно-функциональной организации пластинки роста тела позвонка человека и свиньи в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза.
3. Оценить роль активированных кислородных метаболитов в морфогенезе пластинки роста тела позвонка.
4. Определить оптимальный возрастной период забора донорской хрящевой ткани у человека и свиньи для её использования в качестве источника клеточного материала при разработке тканеинженерных конструкций.
5. Определить морфологические критерии выбора оптимального пассажа первичной культуры клеток, выделенных из фетальной хрящевой ткани зоны роста тела позвонка для создания тканеинженерных конструкций.
6. Изучить возможность ксенотрансплантации клеток первичной культуры фетальных хондробластов человека в условиях хирургического повреждения хрящевой ткани у лабораторных животных.

Научная новизна. Впервые выявлены общие закономерности развития пластинки роста у человека и свиньи в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза. Впервые получены новые сведения о возрастных особенностях развития пластинки роста тела позвонка человека и свиньи, связанные с неравномерной пролиферацией и дифференцировкой клеток, а также пространственно-упорядоченной организацией межклеточного вещества в переднем и заднем отделах пластинки роста у человека, а у свиньи – в её вентральном и дорсальном отделах. Впервые установлены периоды неравномерного развития зоны роста тела позвонка, которые морфологически определяются у человека с 12 недель пренатального развития до 12 лет, а у свиньи – в период с 6 до 12 недель гестации. Впервые определены морфологические критерии выбора фетального гиалинового хряща зоны роста тела позвонка человека и свиньи для использования в качестве источника клеточного материала в тканевой инженерии. Впервые исследованы морфофункциональные характеристики фетальных клеток хондрогенного дифферона *in vitro*, которые могут быть использованы для оценки клеточного материала при разработке тканеинженерных конструкций. Впервые предложена концепция отбора клеточного материала для создания тканеинженерных конструкций. В эксперименте на лабораторных животных

впервые осуществлена ксенотрансплантация фетальных хондробластов человека для замещения дефекта гиалинового хряща.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Выявленные возрастные закономерности структурно-функциональной организации зоны роста тела позвонка человека и свиньи отражают сходство морфогенетических процессов у этих видов млекопитающих и могут быть использованы для уточнения границ критических периодов развития пластинки роста тела позвонка человека и свиньи. Установленная неравномерность пролиферации и дифференцировки клеток хондрогенного дифферона в переднем и заднем отделах пластинки роста тела позвонка человека, а у свиньи – в её дорсальном и вентральном отделах, обуславливает асимметрию роста тела позвонка, что может рассматриваться в качестве одного из патогенетических факторов развития деформаций позвоночника.

Выявленные особенности морфофункциональной организации клеток и матрикса гиалинового хряща зон роста позволяют определить оптимальный возрастной период забора донорской хрящевой ткани человека и свиньи в качестве источника клеточного материала для тканеинженерных конструкций. Определены морфологические критерии оценки и выбора клеточного материала для трансплантации в реконструктивной хирургии.

Предложенная экспериментальная модель дифференцировки хондробластов пластинки роста человека *in vitro* обеспечивает возможность прямого подхода к изучению изменений пластинки роста человека и животных, а также может быть использована для оценки влияния поражающих факторов и эффективности применения лекарственных средств на клетки хондрогенного дифферона *in vitro*.

Результаты данного исследования используются в учебном процессе при преподавании дисциплины «Гистология и эмбриология» в Новосибирском государственном медицинском университете, при изучении курса дисциплин «Анатомия» в Мордовском государственном университете им. Н.П. Огарёва и «Биология свиньи» в Биолого-технологическом институте Новосибирского государственного аграрного университета.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В развитии позвоночного столба человека и свиньи наблюдаются структурно-временные параллели.
2. Асимметрия роста и развития хрящевых пластинок роста тел позвонков грудного отдела человека и свиньи в пренатальном и раннем постнатальном периодах онтогенеза является возрастной особенностью.
3. Фетальные хондробласты человека и свиньи, выделенные из гиалиновой хрящевой ткани зоны роста тела позвонка человека на сроке 12 недель, а свиньи - 6 недель гестации являются оптимальным

источником клеточного материала для разработки тканеинженерных конструкций с целью замещения дефектов суставного хряща.

Апробация материалов диссертации. Материалы диссертации доложены и обсуждены на VI Международном симпозиуме (Чолпон-Ата, 2003), III Всероссийском съезде по трансплантологии и искусственным органам (Москва, 2005), Международном симпозиуме «Клинические и фундаментальные проблемы клеточных биотехнологий» (Новосибирск, 2005), VIII съезде травматологов-ортопедов России (Самара, 2006), V Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития АПК в России» (Красноярск, 2007), Международной научно-практической конференции «Роль биологии и ветеринарной медицины в реализации национального проекта «Развитие АПК на 2008-2012 гг.»» (Оренбург, 2008), Международной научно-практической конференции «Использование инновационных технологий для решения проблем АПК в современных условиях» (Волгоград, 2009), IX Сибирской ветеринарной конференции (Новосибирск, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 40 печатных работ, в том числе 12 – в журналах, рекомендуемых ВАК для публикации материалов докторских диссертаций.

Работа выполнена в Новосибирском государственном педагогическом университете (НГПУ) в рамках научно-технического сотрудничества и при участии сотрудников ФГУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор») – отдел микроскопических исследований, анализа вирусных маркеров и синтеза биологических реагентов, НИИ инновационных медицинских технологий Новосибирского государственного медицинского университета (НГМУ), Научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (НИИТО), Биолого-технологического института Новосибирского государственного аграрного университета (НГАУ). Автор приносит искреннюю благодарность коллегам из указанных учреждений.

Особую признательность за консультативную помощь автор выражает директору НИИТО д-ру мед. наук, проф. М.А. Садовому и заведующей теоретическим отделом вертебральной патологии НИИТО д-ру мед. наук, проф. А.М. Зайдман, которые привлекли его внимание к проблеме нарушений структурно-функциональной организации пластики роста тела позвонка, а также предоставили возможность проведения исследований структурных компонентов тела позвонка человека в норме и при патологии. Автор признателен директору НИИ инновационных медицинских технологий, канд. мед. наук В.А. Валеевой, директору Биолого-технологического института НГАУ д-ру биол. наук, проф. К.В. Жучаеву, директору Института химии антиоксидантов НГПУ канд. хим. наук, проф. А.Е. Просенко и ректору НГПУ д-ру биол. наук, проф. А.Д. Герасёву за техническую и

организационную поддержку на всех этапах выполнения диссертационного исследования. Искренне признателен, за ценную консультативную помощь при выполнении и оформлении работы моему научному консультанту – д-ру биол. наук, проф. Е.И. Рябчиковой.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 290 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и библиографического списка цитируемой литературы, который включает 406 источников, из них 101 отечественных и 305 – зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 160 рисунками и 11 таблицами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили тела грудных позвонков свиньи и образцы зон роста тел позвонков грудного отдела человека, которые получали из абортивного материала, а также от погибших людей, не имевших признаков патологии опорно-двигательного аппарата. Хондробласты выделяли из абортивного материала, полученного из лицензированных учреждений МЗ РФ, действующих в рамках законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан, в соответствии с современными этическими нормами и с подписанием Информированного согласия. Характеристика материала приведена в таблице 1.

Фрагменты тел позвонков грудного отдела эмбрионов, а также плодов человека и свиньи породы Сибирская мясная (СМ-1) фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина и в 4%-ном растворе параформа, приготовленного на растворе Хенкса. Позвонки плодов декальцинировали в забуференном растворе ЭДТА. Материал обезжизняли в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в целлоидин-парафин. На санном микротоме готовили серийные срезы толщиной 3-5 мкм и монтировали на предметные стекла.

Для изучения общей морфологической картины срезы окрашивали гематоксилином Бёмера и эозином. Коллаген выявляли по Маллори в модификации Б. Ромейса (1954). Локализацию кальция в клетках выявляли по Коссу (Пирс Э., 1962). Гликоген и гликопротеины определяли в реакции с реактивом Шиффа по Мак-Манусу. Реакцию на суммарные кислые гликозаминогликаны (ГАГ) ставили с альциановым синим по С. Стивдену. Локализацию кератансульфата (КС), хондроитинсульфата (ХС), гиалуроновой кислоты в клетках и межклеточном веществе, а также их пространственно-упорядоченную организацию в межклеточном веществе хрящевой ткани пластинки роста (ПР) изучали в реакции с толудиновым синим при pH 1,5; 2,5 и 5,0. Пространственную организацию коллагена в межклеточном

веществе определяли по Эбнеру и в реакции с пикросириусом красным (Дедух Н.В. 1988). Интенсивность рефракции оценивали на срезах в поляризованном свете. Исследования проводились на базе лаборатории морфологии ИГПУ, отдела микроскопических исследований, анализа вирусных маркеров и синтеза биологических реагентов ГНЦ ВБ «Вектор», кафедры свиноводства НГАУ.

Таблица 1. Характеристика исследуемого материала

№ п/п	Объект исследования	Возрастной период	Кол-во образцов
1	Первичная культура фетальных клеток человека	12 недель	100
2	Зона роста тела позвонка эмбриона человека	8 недель	45
3	Зона роста тела позвонка плода человека	12 недель	57
4	Пластинка роста тела позвонка человека	Новорожденный - 14 лет	187
Всего			389
5	Зона роста тела позвонка предплода свиньи	4 недели	60
6	Зона роста тела позвонка плода свиньи	6 - 12 недель	367
7	Пластинка роста тела позвонка свиньи	Новорожденный - 40 суток	259
Всего			686

Экспрессию белков генов p-53 и Bcl-2 определяли методом иммуногистохимического анализа в реакции с вторичными антителами. Индекс апоптоза рассчитывали по отношению числа клеток в состоянии апоптоза к общему количеству клеток в препарате и выражали в процентах (Archer C.D., 1998).

Интенсивность реакции на активированные кислородные метаболиты (АКМ) в образцах нативной хрящевой ткани ПР тел позвонков новорожденных поросят, а также поросят в возрасте 7 - 40-а суток оценивали в реакции с нитротетразолиевым синим (Hill K.S., 1978). Дифференциальное определение свободнорадикального оксида азота в хрящевой ткани ПР оценивали по локализации его селективного маркера – фермента NO-синтазы (Mayer B., 1995).

Исследования проводились на базе лаборатории морфологии НГПУ и кафедры свиноводства НГАУ.

Для получения первичной культуры клеток использовали хрящевые тела позвонков плодов человека на сроке 12 недель гестации непосредственно после медицинского аборта от клинически здоровых женщин. Полученную первичную культуру клеток культивировали в концентрации 3×10^5 кл/мл в среде ДМЕМ/F12 (1:1) с добавлением 20% фетальной сыворотки крови плодов коровы при 37°C в течение 4 пассажей на протяжении 12 дней. Каждые 3 дня клетки снимали с подложки смесью трипсина с версеном, четыре равные части центрифугата отбирали для проведения исследований, оставшиеся клетки пересевали. Исследования проводили на базе НИИ клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор», НИИ инновационных медицинских технологий НГМУ, лаборатории морфологии НГПУ.

Для морфологических и цитохимических исследований клетки в суспензии и монослое на стекле фиксировали в метиловом спирте. Для получения обзорных препаратов и морфометрии клетки окрашивали гематоксилином и эозином. Распределение гликогена и гликопротеидов изучали посредством ШИК-реакции и проведения контроля с амилазой. Суммарные кислые ГАГ выявляли альциановым синим. Для дифференцированного выявления КС, ХС и гиалуроновой кислоты ставили реакцию с толуидиновым синим при значениях рН раствора красителя 1,5; 2,5 и 5,0. Для иммуноцитохимического определения коллагена II типа ставили реакцию с вторичными антителами (Novocastra Laboratories Ltd., UK) к коллагену II типа.

Для проведения ультраструктурного анализа клетки снимали с поверхности монослоя смесью трипсина (0,02%) и версена (0,025%) в соотношении 1:1. Взвесь клеток центрифугировали, осадок фиксировали в 4%-м растворе параформа, дофиксировали 1%-м раствором OsO_4 , обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне, пропитывали и заливали в смесь эпон – аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Raichert (Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты изучали в электронном микроскопе Н-600 (Hitachi, Япония). Ультраструктурные исследования проводили на базе отдела микроскопических исследований, анализа вирусных маркеров и синтеза биологических реагентов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Все манипуляции в ходе ксенотрансплантации фетальных хондробластов человека в суставной дефект крыс проводили в соответствии с международными принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. У всех крыс – самцов линии Вистар массой 250 граммов в области межмышечковой ямки дистального эпифиза бедренной

кости стоматологическим бором диаметром 2,5 мм производили дефект суставного хряща на глубину до субхондральной кости.

У крыс группы I (15 особей) дефект оставляли свободным; у животных группы II (15 особей) – заполняли хитозановым гелем; у крыс группы III (15 особей) – тканеинженерной конструкцией на основе хитозанового геля и первичной культуры фетальных хондробластов человека второго пассажа в количестве 3×10^5 клеток. Рану послойно ушивали шелком. В течение двух недель послеоперационного периода один раз в сутки внутримышечно вводили антибиотик линкомицин в дозе 5 мг. На 60-е сутки животных под эфирным наркозом выводили из эксперимента и выделяли фрагменты дистального эпифиза бедренной кости для проведения морфогистохимического анализа. Данный фрагмент исследований проводили на базе лаборатории морфологии НГПУ и НИИ инновационных медицинских технологий НГМУ.

Измерение морфометрических характеристик проводили с помощью комплекса программ AxioVision. Статистическую обработку данных осуществляли по общепринятым методикам с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Структурно-функциональная характеристика пластинки роста тела позвонка человека и свиньи в онтогенезе

Позвоночный столб человека на сроке 8 недель, а свиньи на сроке 4 недели гестации представлен мезенхимными телами позвонков, разделенными клетками формирующихся межпозвонковых дисков. Мезенхимные клетки имеют уплощенную или полигональную форму. Ядро округлое с большим количеством гетерохроматина. Цитоплазма обильная, умеренно базофильная, содержит пылевидный ШИК-позитивный материал, исчезающий после предварительной обработки срезов амилазой, а также следовые количества суммарных ГАГ. Межклеточное вещество выражено слабо и бледно окрашивается на коллаген по Маллори. Окрашивание толуидиновым синим при значении pH раствора красителя 5,0 позволяет наблюдать слабо выраженную реакцию в цитоплазме и межклеточном веществе на гиалуроновую кислоту. Реакция с толуидиновым синим при pH 1,5 и 2,5 на ХС и КС отрицательна. Рефракция макромолекул несультатированных ГАГ в поляризованном свете в препаратах позвоночника человека и свиньи в этот период не выявляется.

Хрящевая модель тела позвонка человека на 12-й неделе и свиньи на 6-й неделе гестации представлена мелкими клетками округлой формы, располагающимися в одиночных округлых или овальных лакунах.

Слаборазвитый матрикс бледно окрашивается на коллаген по Маллори и характеризуется невысоким содержанием кислых ГАГ, которые по данным поляризационно-оптического анализа присутствуют в низкополимерной форме. Полученные результаты позволяют характеризовать эти клетки как низкодифференцированные, для которых характерно мелкое, интенсивно базофильное ядро округлой формы, расположенное в центре клетки, и высокое ядерно-цитоплазматическое отношение (рис. 1 А).

Степень дифференцировки клеток возрастает от периферии хрящевой модели тела позвонка к центру оксификации, что находит свое отражение в увеличении объема хрящевого матрикса и усилении клетками синтеза его компонентов. С повышением степени дифференцировки хондробластов изменяется их морфология. Хондробласты располагаются в овальных лакунах и принимают уплощенную форму. Снижается их ядерно-цитоплазматическое отношение (рис. 1 А), ядро становится овальным или приобретает бобовидную форму, увеличивается коэффициент формы ядра (рис. 1 В). Уплотнение ядра и цитоплазмы нарастает ближе к центру оксификации.



Примечание: различия показателей достоверны (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Рис. 1. Морфометрические показатели клеток зоны роста тела позвонка человека на сроке 12 недель гестации: А — ядерно-цитоплазматическое отношение; В — коэффициент формы ядра; С — содержание низкодифференцированных клеток в хрящевой ткани зоны роста тела позвонка свиньи.

На границе с центром оксификации располагаются наиболее дифференцированные хондробласты, представляющие собой самые крупные клетки с низким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 1 А). Их цитоплазма и территориальный матрикс обильно заполнены сульфатированными ГАГ. Ядро располагается в центре клетки и имеет самый высокий показатель коэффициента формы ядра (рис. 1 В). На срезах, выполненных под углом к сагиттальной плоскости, отчетливо видна

дисковидная форма ядра. Уплющенное с двух полюсов округлое ядро при изменении плоскости его расположения в клетке дает картину круга или овала, либо вытянутого профиля.

Полученные морфофункциональные характеристики позволяют использовать в качестве критериев дифференцировки клеток хондрогенного дифферона не только площадь клетки и ядерно-цитоплазматическое отношение, но и предложенный нами новый параметр – коэффициент формы ядра. Эти критерии могут быть использованы для анализа клеточного материала, выделенного из зон роста тел позвонков человека и свиньи при культивировании *in vitro* с целью последующего использования в тканевой инженерии.

Сравнение формирующихся хрящевых тел позвонков 12-недельного плода человека и 6-недельного плода свиньи выявило различия в развитии переднего и заднего отделов зоны роста (ЗР) у человека, а у свиньи вентрального и дорсального отделов соответственно, обусловленные степенью дифференцировки хондробластов и зрелости матрикса гиалинового хряща. Смещенный к передней (вентральной) продольной связке центр оссификации определяет неравномерное распределение клеток разной степени дифференцировки в теле позвонка. Преобладание в заднем (дорсальном) отделе хрящевого тела позвонка низкодифференцированных хондробластов (рис. 1 С) и слабо выраженный синтез клетками компонентов межклеточного вещества, имеющего достоверно низкий показатель рефракции по сравнению с передним (вентральным) отделом, указывают на отставание в развитии заднего (дорсального) отдела по сравнению с передним (вентральным). Следует отметить, что в переднем (вентральном) отделе тела позвонка отмечается начало формирования колонковых структур, в то время как со стороны заднего (дорсального) отдела клетки не имеют строго определенной векторной направленности. Таким образом, у человека на сроке 12 недель, а свиньи – 6 недель гестации впервые определяется асимметрия в развитии хрящевого тела позвонка, обусловленная расположением в переднем (вентральном) отделе полюса высокой метаболической активности, а в заднем (дорсальном) отделе – полюса низкой активности.

У человека в период от новорожденности до 1 года, а у свиньи – до 8 недель пренатального развития происходит формирование пластинки роста (ПР) тела позвонка. На сагиттальных срезах тело позвонка новорожденного имеет овальную форму и выполнено хрящевой тканью. В центре тела позвонка расположена зона остеогенеза, в которой определяются сосуды и примитивные костные балки с включениями хрящевой ткани. Вокруг зоны остеогенеза располагаются хрящевые клетки, которые формируют зону роста. Следует подчеркнуть, что на данном этапе развития типичное строение, характерное для ПР, отсутствует. Морфологически идентифицируются зоны резервного, пролиферирующего и гипертрофического хряща. Одиночные

клетки резервной зоны лежат в овальных лакунах. Крупное округлое ядро занимает практически весь объем цитоплазмы, в которой выявляются мелкие гранулы ШИК-положительного вещества. При окрашивании толуидиновым синим при pH 5,0 в цитоплазме этих клеток отмечается резко положительная реакция на гиалуроновую кислоту. Межтерриториальный матрикс бледно окрашивается альциановым синим.

Овальные клетки пролиферирующей зоны располагаются попарно или по 3-4 в одной лакуне и формируют изогенные группы. Плоскость их деления не имеет строгой направленности. Цитоплазма и межтерриториальный матрикс бледно окрашиваются на суммарные ГАГ альциановым синим. В цитоплазме выявляются редкие мелкие гранулы ШИК-положительного вещества. Одиночно лежащие клетки этой зоны имеют округлое ядро, цитоплазма и территориальный матрикс интенсивно окрашиваются альциановым синим. В межтерриториальном матриксе альцианопозитивное вещество выявляется в виде крупных гранул. В зоне гипертрофированного хряща клетки располагаются группами в крупных лакунах округлой или овальной формы и формируют кластеры. Матрикс вокруг лакун неравномерно окрашивается альциановым синим.

Вышеописанные морфофункциональные характеристики свидетельствуют, что процессы пролиферации хондробластов в данный возрастной период опережают созревание хрящевой ткани. Подтверждением невысокой степени дифференцировки клеток является наличие низкополимерных ГАГ в матриксе и особенности морфологии хондробластов. В данный возрастной период рост направлен, прежде всего, на увеличение хрящевой модели тела позвонка, что обуславливает асинхронность пролиферации клеток и их дифференцировки. Отражением процесса увеличения хрящевой модели преимущественно за счет активной пролиферации хондробластов, а не их синтетической активности, является несовершенный остеогенез. Разобщение пролиферации и синтеза клетками специфических для хряща биополимеров может быть связано с отсутствием компрессии как одного из важнейших регуляторов дифференцировки хондробластов.

Следует отметить неравномерное развитие ЗР тела позвонка человека и свиньи в переднем (вентральном) и заднем (дорсальном) отделах. Колонковые структуры начинают формироваться только в переднем (вентральном) отделе ЗР, плоскость расположения хондробластов параллельна продольной оси тела позвонка. Межклеточное вещество хорошо выражено, характеризуется умеренной реакцией на кислые ГАГ. Мелкие альцианопозитивные гранулы равномерно распределены в межтерриториальном матриксе. В заднем (дорсальном) отделе клетки гипертрофического слоя локализуются группами и не имеют строгой векторной направленности. Межклеточное вещество слабо выражено. При

реакции на суммарные кислые ГАГ наблюдаются интенсивно альцианпозитивные крупногранулярные структуры. Степень рефракции макромолекул ХС, КС, гиалуриновой кислоты и коллагена в межклеточном веществе переднего отдела ЗР тела позвонка человека превышает соответствующий показатель заднего отдела (табл. 2). Содержание низкодифференцированных клеток в заднем отделе ЗР тела позвонка превышает этот показатель на 22,55 % по сравнению с передним отделом. Указанные признаки могут указывать на замедление дифференцировки клеток в заднем отделе ЗР по сравнению с передним.

У человека в возрасте 1 года, а у свиньи на сроке 8 недель гестации ПР представлена гиалиновым хрящом, в котором отчетливо идентифицируются 5 зон: резервная, пролиферации, созревания, гипертрофическая и зона остеогенеза. Клетки резервной зоны имеют овальную форму, крупное округлое ядро и хорошо развитую цитоплазму. По направлению от резервной зоны к зоне созревания происходит уплощение хондробластов, меняется и морфология ядра. В клетках верхних отделов колонковых структур ядро образует инвагинаты и по мере приближения к зоне гипертрофии принимает уплощенно-вогнутую форму.

Таблица 2. Показатель рефракции биополимеров межклеточного вещества зоны роста тела позвонка новорожденного

Зоны роста	Кераган- сульфат	Хондроитин- сульфат	Гиалуриновая кислота	Коллаген
	задний/ передний	задний/ передний	задний/ передний	задний/ передний
Резервная	1,15 ± 0,14***	1,24 ± 0,15 **	3,28 ± 0,25***	4,77 ± 0,33***
	1,93 ± 0,11	1,98 ± 0,17	5,53 ± 0,21	6,97 ± 0,31
Пролиферации	0,12 ± 0,06***	1,52 ± 0,17***	1,73 ± 0,13***	2,22 ± 0,31***
	0,81 ± 0,12	2,61 ± 0,16	2,88 ± 0,17	4,41 ± 0,29
Гипертро- фии	1,68 ± 0,17**	2,41 ± 0,22***	4,45 ± 0,21***	5,23 ± 0,23 ***
	2,52 ± 0,21	4,98 ± 0,34	6,73 ± 0,27	7,87 ± 0,24

Примечание: различия степени рефракции между задним и передним отделами достоверны (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Неравномерность развития тел позвонков в заднем (дорсальном) и переднем (вентральном) отделах отчетливо иллюстрируется гистохимическим и поляризационно-оптическим анализом. В переднем (вентральном) отделе ПР альцианпозитивный материал располагается в межклеточном веществе в виде мелких гранул, а матрикс заднего (дорсального) отдела ПР окрашивается гомогенно. В препаратах и человека, и свиньи интенсивность рефракции макромолекул гиалуриновой кислоты, ХС, и коллагена в межклеточном веществе ПР переднего (вентральном) отдела превышает данные показатели заднего (дорсального) отдела (табл. 3, 4). Костные балки

со стороны передней (вентральной) поверхности тела позвонка мощные и содержат незначительные включения хрящевой ткани по сравнению с задним (дорсальным) отделом. В зоне энхондрального остеогенеза сосуды инвазируют лишь матрикс, прилежащий к гипертрофическим клеткам, что является следствием интенсивного роста тела позвонка и проявлением динамического единства процессов хондрогенеза и остеогенеза. В данный период развития вся совокупность морфогенетических процессов, в том числе и несовершенный остеогенез, являются отражением увеличения массы тел позвонков и активного замещения их хрящевой модели на костную.

Таблица 3. Показатель рефракции биополимеров межклеточного вещества пластинки роста тела позвонка годовалого ребенка

Зоны роста	Кератан-сульфат	Хондроитин-сульфат	Гиалуроновая кислота	Коллаген
	задний/передний	задний/передний	задний/передний	задний/передний
Резервная	2,23 ± 0,26	1,31 ± 0,17 ***	3,34 ± 0,29***	4,55 ± 0,30***
	2,91 ± 0,32	2,92 ± 0,11	5,97 ± 0,22	6,85 ± 0,29
Пролиферации	0,62 ± 0,19	1,61 ± 0,15***	1,83 ± 0,15***	2,32 ± 0,21***
	0,98 ± 0,13	2,93 ± 0,12	2,97 ± 0,11	4,61 ± 0,18
Созревания	1,76 ± 0,49	2,55 ± 0,24***	4,43 ± 0,18***	5,41 ± 0,21 **
	2,73 ± 0,33	5,11 ± 0,26	6,81 ± 0,21	7,87 ± 0,24
Гипертрофии	3,25 ± 0,61	3,43 ± 0,23***	5,57 ± 0,23***	6,52 ± 0,38**
	4,88 ± 0,77	5,79 ± 0,29	7,72 ± 0,31	8,75 ± 0,66

Примечание: различия степени рефракции между задним и передним отделами достоверны (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

Таблица 4. Показатели рефракции биополимеров межклеточного вещества хрящевой ткани пластинки роста тела позвонка 8-недельного плода свиньи

Зоны роста	Кератан-сульфат	Хондроитин-сульфат	Гиалуроновая кислота	Коллаген
	дорсальный/вентральный	дорсальный/вентральный	дорсальный/вентральный	дорсальный/вентральный
Резервная	1,52 ± 0,13	3,97 ± 0,16 ***	5,34 ± 0,41	5,47 ± 0,28
	1,56 ± 0,27	6,78 ± 0,35	5,52 ± 0,35	5,39 ± 0,17
Пролиферации	0,45 ± 0,18	2,19 ± 0,24 ***	4,42 ± 0,23	3,22 ± 0,34
	0,51 ± 0,42	4,92 ± 0,19	4,38 ± 0,31	3,31 ± 0,39
Созревания	1,73 ± 0,51	5,19 ± 0,27 ***	7,98 ± 0,45	9,71 ± 0,28 ***
	1,77 ± 0,64	8,72 ± 0,23	8,41 ± 0,48	13,91 ± 0,43
Гипертрофии	3,86 ± 0,61	13,53 ± 0,43***	15,57 ± 0,63 **	18,97 ± 0,58***
	4,25 ± 0,67	18,76 ± 0,39	18,23 ± 0,32	23,75 ± 0,66

Примечание: различия степени рефракции между дорсальным и вентральным отделами достоверны (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

Ширина ПР свиньи в вентральном отделе превышает соответствующий показатель дорсального отдела на 13,74 %.

У человека в возрасте 3-7 лет неравномерность развития переднего и заднего отделов ПР тела позвонка становится менее заметной. Степень рефракции основных биополимеров хрящевого матрикса – гиалуриновой кислоты, ХС, КС и коллагена в препаратах ПР переднего отдела тела позвонка превосходит эти показатели по сравнению с задним отделом (табл. 5). У свиньи на сроке 12 недель гестации и до рождения неравномерность развития дорсального и вентрального отделов ПР гистохимическими методами анализа не определяется. Ширина ПР в вентральном отделе на 4,45% статистически достоверно превышает данный показатель дорсального отдела.

Структурная организация ПР человека и свиньи в этот возрастной период не имеет принципиальных различий. Отчетливо определяются все зоны, характерные для сформированной ПР. Развитая зона созревающего и гипертрофического хряща, с одной стороны, и глубокая инвазия кровеносными сосудами матрикса хряща до клеток зоны созревания – с другой, свидетельствуют об активном росте тела позвонка. Динамическое единство процесса роста, обусловленного пролиферацией хрящевых клеток и остеогенезом, в данный возрастной период смещено в сторону последнего.

У детей в возрасте 11 лет, а у свиньи в течение 7 - 20 суток постнатального периода онтогенеза структурная организация ПР претерпевает существенные изменения.

Таблица 5. Показатель рефракции биополимеров межклеточного вещества пластинки роста тела позвонка человека 3-7 лет

Зоны роста	Кератан-сульфат	Хондроитин-сульфат	Гиалуриновая кислота	Коллаген
	задний/ передний	задний/ передний	задний/ передний	задний/ передний
Резервная	1,49 ± 0,24* 0,87 ± 0,11	3,17 ± 0,14* 3,99 ± 0,33	2,11 ± 0,80* 5,60 ± 1,22	2,60 ± 0,31** 3,93 ± 0,18
Пролиферации	0,93 ± 0,16* 0,44 ± 0,13	1,36 ± 0,11* 1,92 ± 0,16	1,59 ± 0,53* 3,36 ± 0,58	2,51 ± 0,41* 3,87 ± 0,35
Созревания	1,62 ± 0,34*** 3,84 ± 0,27	6,67 ± 0,41** 8,72 ± 0,53	4,22 ± 1,05** 9,56 ± 1,50	9,85 ± 0,37* 10,91 ± 0,21
Гипертрофии	3,44 ± 0,29*** 4,98 ± 0,21	6,81 ± 0,21** 8,92 ± 0,22	6,65 ± 0,21*** 10,84 ± 0,31	10,72 ± 0,31*** 13,84 ± 0,39

Примечание: различия степени рефракции между задним и передним отделами достоверны (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

Резервная зона у человека по ширине занимает 1/3 объема ПР, что особенно хорошо видно на срезах, окрашенных альциановым синим на суммарные ГАГ. Клетки резервной зоны вытянутой формы, с продолговатым

ядром, содержащим преимущественно гетерохроматин. Цитоплазма умеренно базофильная. В более глубоких слоях резервная зона без четкой границы переходит в зону пролиферации. Образовавшиеся в результате деления клетки изменяют свою морфологию. Ядро молодых клеток бобовидной формы. Более зрелые клетки пролиферирующей зоны имеют уплощенное ядро. Скопления из двух-трех клеток уплощенной формы образуют изогенные группы, переходящие в колонковые структуры зоны пролиферирующего и созревающего хряща. В толще зоны пролиферации в плоскости, параллельно продольной оси тела позвонка, отмечается перфорация хрящевого матрикса кровеносными сосудами.

Зоны созревающего и гипертрофического хряща узкие, толщиной в 3-5 клеток овальной формы с округлым ядром, или в форме двояковогнутого диска. Матрикс хряща имеет фибриллярную структуру и неравномерно окрашивается гематоксилином. Особенностью этой зоны является присутствие клеток с признаками апоптоза и крупных бесклеточных лакун. Следует отметить, что в зоне остеогенеза костные балки вплотную прилегают к матриксу хряща. Широкие резервная зона и зона пролиферации, а также узкие зоны созревания и гипертрофии (которая остаётся перекрытой костными балками в зоне остеогенеза) позволяют заключить, что в данный возрастной период рост тела позвонка обусловлен главным образом преобладанием хондрогенеза, а не сопряженным хондро- и остеогенеза. У человека в возрасте 11 лет сохраняется неравномерное развитие клеток и матрикса в области переднего и заднего отделов ПР тела позвонка. Со стороны передней продольной связки межклеточное вещество хрящевой ткани вокруг изогенных групп клеток окрашивается альциановым синим в виде мелких гранул, в отличие от гомогенной окраски в заднем отделе ПР. В препаратах, где морфогистохимическими методами неравномерность развития не определяется, она выявляется топо-оптическими реакциями на сульфатированные и несulfатированные ГАГ. Уровень рефракции, отражающий степень пространственно-упорядоченной организации макромолекул гиалуроновой кислоты, КС и ХС межклеточного вещества ПР в переднем отделе выше, чем в заднем. Уровень рефракции макромолекул коллагена не имеет достоверных различий.

У свиньи в возрасте 7-20 суток, как и у человека 11-летнего возраста, четко прослеживаются особенности морфогенетических преобразований, приводящих к структурному обособлению ПР и замыкательной пластинки (ЗП) тела позвонка. В ПР 7-суточного поросенка отмечается формирование сосудистых каналов в матриксе, которые проходят в плоскости, параллельной продольной оси тела позвонка. У поросят в возрасте 14 суток в ПР отмечается расширение сосудистых каналов за счет деструкции матрикса хрящевой ткани. Цитоплазма клеток эндотелия кровеносных сосудов и хондробластов зоны пролиферации характеризуется умеренной реакцией на АКМ и

интенсивной реакцией на NO-синтазу, что свидетельствует об интенсивном синтезе свободного радикала – NO. Можно полагать, что локализация в матриксе хряща вокруг сосудистых каналов кластеров из 4 и более клеток в одной лакуне является реакцией хондробластов на повреждение свободнорадикальным NO. В цитоплазме данных клеток выявляется также высокое содержание Ca^{2+} , который может повышать активность конститутивной формы NO-синтазы (Maier В., 1995). Иммуногистохимическая реакция показывает высокий уровень экспрессии белка p53 в хондробластах зоны пролиферации, тогда как белок Bcl-2 регистрируется лишь в единичных клетках. Повышение в клетках активности АКМ, концентрации ионов Ca^{2+} и экспрессии белка p53 могут указывать на их участие в свободнорадикальном повреждении матрикса хрящевой ткани и гибели хондробластов зоны пролиферации по механизму апоптоза. При этом одним из ведущих свободнорадикальных соединений выступает NO.

В возрасте 20 суток в центре зоны пролиферации ПР свиньи, как в вентральном, так и дорсальном отделах, четко идентифицируются два центра деструкции хрящевого матрикса. Лакуны клеток разрушены. Ядра – с признаками пикноза, а цитоплазма – в состоянии плазморексиса. В межтерриториальном матриксе отчетливо видны оксифильные демаскированные фибриллы. Несмотря на отсутствие морфологических и гистохимических различий в структурной организации матрикса хрящевой ткани дорсального и вентрального отделов ПР, процесс оссификации осуществляется более интенсивно в первом, что может свидетельствовать как о более низкой степени дифференцировки клеток, так и более низкой структурной организации межклеточного вещества дорсального отдела ПР по сравнению с вентральным. Индекс апоптоза в клетках зоны пролиферации дорсального отдела ПР статистически достоверно превышает таковой вентрального отдела на 12,06%.

В препаратах тел позвонков человека 12-летнего возраста и свиньи в возрасте 30-суток, в толще зоны пролиферации в плоскости, перпендикулярной продольной оси тела позвонка, отмечается активная инвазия межклеточного вещества хрящевой ткани кровеносными сосудами. В образцах ПР 30-суточных поросят в клетках эндотелия сосудов отмечается резко положительная реакция на NO-синтазу. В цитоплазме хондробластов, локализованных на периферии сосудистых каналов определяется повышение внутриклеточного содержания Ca^{2+} и экспрессии белка p53. Данные клетки характеризуются отсутствием экспрессии белка Bcl-2, что возможно является особенностью хондробластов провизорного хряща, поскольку деление клеток в зоне пролиферации происходит достаточно быстро и обеспечение длительного «выживания» клеток в данном компартменте ПР не является обязательным. Индекс апоптоза в хондробластах зоны пролиферации ПР свиньи в её дорсальном отделе статистически достоверно превышает

соответствующий показатель вентрального отдела на 8,73%. Дистрофия клеток и матрикса вокруг сосудистых каналов приводит к оссификации и остеогенезу.

Неравномерность развития заднего (дорсального) и переднего (вентрального) отделов ПР определяется более широким фронтом остеогенеза в зоне пролиферации ПР в её заднем отделе у человека, и дорсальном у свиньи.

В более поздний интервал постнатального периода онтогенеза (у человека старше 14-лет, а у свиньи старше 40-суток) неравномерность морфогенетических процессов в заднем (дорсальном) и переднем (вентральном) отделах ПР доступными методами не определяется.

Объяснение механизма структуризации ПР человека и свиньи может быть следующим. У человека в возрасте 11-12 лет, а у свиньи в период 7-30 суток ПР в зоне энхондрального остеогенеза плотно перекрыта костной тканью, и её рост осуществляется за счет увелечения зоны пролиферации. Расположенные в толще гиалинового хряща хондробласты пролиферирующей зоны оказываются удаленными от источников трофики – сосудов зоны энхондрального остеогенеза с одной стороны, а с другой – межпозвоночного диска. Вследствие этого клетки подвергаются дистрофии и гибнут. Именно в этой плоскости происходит инвазия хрящевого матрикса сосудами. Наличие крупных кровеносных сосудов в зоне пролиферации приводит к увеличению напряжения кислорода, повышенной генерации АКМ эндотелиальными клетками и хондробластами, свободнорадикальному повреждению компонентов хрящевого матрикса на периферии сосудистых каналов и апоптозу хондробластов.

Асимметричное расположение центра оссификации в теле позвонка человека и свиньи изначально является фактором, обуславливающим неравнозначность трофики и влияния регулирующих факторов (гормонов, факторов роста, цитокинов) на хондробласты переднего и заднего отделов ПР тела позвонка человека, а у свиньи – её дорсального и вентрального отделов, что предполагает существование морфофункциональных различий клеток в соответствующих отделах ПР и различной ответной реакции на регулирующие воздействия. В итоге это приводит к асимметрии роста ПР в переднем и заднем отделах тела позвонка человека, а у свиньи в дорсальном и вентральном отделах.

Анализ полученных результатов позволяет заключить: у человека, начиная с 12 недель (плодный период), а затем в первую (от рождения и до 6-7 лет), а также вторую фазы развития позвоночника (от 7 до 12 лет) морфогенетические процессы, обеспечивающие увеличение массы тел позвонков и структуризацию их элементов, происходят неравномерно. Эта закономерность характерна и для свиньи, с той лишь разницей, что соответствующие фазы развития тел позвонков реализуются с 6 недель

пренатального периода онтогенеза до 30 суток постнатального периода онтогенеза. Неравномерность развития структурных элементов тела позвонка в более поздние периоды онтогенеза доступными методами не определяется. Полученные данные об особенностях структурно-функциональной организации ПР тела позвонка человека и свиньи в онтогенезе позволили провести параллели и выделить общие закономерности её гистогенеза (табл. 7).

Неравномерность роста и развития заднего (дорсального) и переднего (вентрального) отделов ПР тела позвонка в период её формирования и структуризации, является морфологической основой развития возможных деформаций тел позвонков как у человека, так и свиньи. Очевидно, что при одинаковых воздействиях гормонов, цитокинов, факторов роста на клетки ПР, например, во время гормонального пика в период интенсивного роста и полового созревания, реакция клеток разной степени дифференцировки неодинакова. С этой точки зрения, возрастные особенности формирования ПР могут рассматриваться как морфологическая основа такой классической ортопедической патологии позвоночного столба человека, как идиопатический сколиоз. Наши данные согласуются с предложенной М.Г. Дудиным (2003) концепцией этиопатогенеза идиопатического сколиоза, которая постулирует, что при нарушении гормонального фона, например, при высоком содержании кальцитонина и соматотропина, передние отделы тела позвонка опережают в развитии задние на уровне суставных отростков. Компенсация этого состояния происходит за счёт торсии удлинённых передних отделов вокруг относительно укороченных задних.

Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать параметры отбора и оценки клеточного материала для использования в клеточных технологиях. Так, оптимальным периодом отбора хрящевой ткани в качестве источника клеточного материала для создания тканеинженерных конструкций является у человека срок 12 недель, а у свиньи – 6 недель гестации, поскольку содержание низкодифференцированных клеток в гиалиновом хряще зоны роста составляет более 70%. Для оценки степени дифференцировки клеток целесообразно использовать совокупность параметров: коэффициент формы ядра, площадь клетки, ядерно-цитоплазматическое отношение. Вместе с тем, широкому внедрению ксенотрансплантации в практику должны предшествовать комплексные исследования по изучению закономерностей пролиферации и дифференцировки клеток в динамике их развития *in vitro*.

Таблица. 7. Структурно-временные параллели формирования пластинки роста тела позвонка человека и свиньи в онтогенезе

Человек	Свинья
8 недель (эмбриональный период)	4 недели (предплодный период)
12 недель (начало плодного периода)	6 недель (плодный период)
1 год (постнатальный период)	8 недель (плодный период)
3-7 лет (постнатальный период)	12 недель – новорожденный
11 лет (постнатальный период)	7-20 суток (постнатальный период)
12 лет (постнатальный период)	30 суток (постнатальный период)
14 лет (постнатальный период)	40 суток (постнатальный период)

2. Структурно-функциональная характеристика первичной культуры клеток, выделенных из зоны роста тела позвонка плода человека на 12 неделе гестации

Первичная культура клеток, выделенная из хрящевой зоны роста тела позвонка плода человека, на первом пассаже выглядит разреженной и представлена тремя типами клеток. Клетки всех типов имеют округлую или овальную форму и статистически достоверные различия площади клетки, коэффициента формы ядра и ядерно-цитоплазматического отношения (рис. 2). Мелкие клетки обозначены как клетки 1-го типа, среднего размера – как клетки 2-го типа и самые крупные – клетки 3-го типа.

Округлые клетки 1-го типа площадью $60,90 \pm 3,72$ мкм², являются преобладающими на первом пассаже, их содержание достигает 78,93%. Округлое ядро содержит преимущественно гетерохроматин и занимает значительный объем клетки. Цитоплазма слабо выражена, умеренно базофильная.

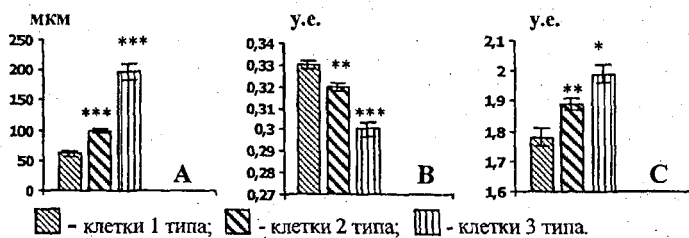
Клетки 2-го типа преимущественно овальные, площадью $98,5 \pm 2,31$ мкм², составляют 18,03 % клеточной популяции. Ядро лежит эксцентрично и, в зависимости от плоскости расположения в клетке, имеет бобовидную, овальную или форму уплощенного диска. Цитоплазма обильная, умеренно оксифильная.

Клетки 3-го типа содержат крупное овальное ядро с небольшим количеством эухроматина. В цитоплазме выявляются мелкие оксифильные гранулы. Это самая малочисленная группа клеток на данном пассаже, составляющая 3,05%.

При постановке ШИК-реакции в цитоплазме клеток 1-го типа выявляется пылевидный интенсивно окрашенный материал. Предварительная

инкубация клеток в растворе амилазы полностью подавляет реакцию. Клетки 2-го и 3-го типов содержат гранулярное, интенсивно окрашенное реактивом Шиффа вещество, заполняющее весь объем цитоплазмы. Гранулы в цитоплазме клеток 3-го типа крупнее, чем в клетках 2-го типа и локализованы преимущественно на периферии. Обработка срезов амилазой значительно понижает интенсивность ШИК-реакции.

Клетки всех типов различаются как по интенсивности окрашивания альциановым синим на кислые ГАГ, так и по морфологии альцианопозитивных гранул. В клетках 1-го типа мелкодисперсное вещество заполняет весь объем цитоплазмы. Клетки 2-го и 3-го типов, напротив, содержат крупные гранулы альцианопозитивного вещества, расположенные диффузно. В реакции с толуидиновым синим на КС в цитоплазме клеток 1-го типа отмечается незначительное количество пылевидного бледно окрашенного вещества. Клетки 2-го и 3-го типов характеризуются накоплением мелких, умеренно окрашенных в лиловый цвет гранул, диффузно расположенных в цитоплазме. При постановке реакции на ХС в клетках 1-го типа интенсивность окрашивания и распределение толуидинпозитивного материала аналогичны таковым при выявлении КС. В клетках 2-го и 3-го типов содержатся многочисленные крупные гранулы, воспринимающие толуидиновый синий при значении pH 2,5 раствора красителя, которые сливаются и заполняют всю цитоплазму.



Примечание: различия между клетками 1, 2 и 3 типов достоверны (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Рис. 2. Морфометрические показатели клеток 1, 2 и 3-го типов первичной культуры. А – площадь клетки; В – ядерно-цитоплазматическое отношение; С – коэффициент формы ядра.

Анализ величины ядерно-цитоплазматического отношения всех типов клеток свидетельствует о статистически достоверном снижении этого показателя от клеток 1-го типа к клеткам 3-го типа, что говорит об увеличении степени дифференцировки клеток, равно как и изменения коэффициента формы ядра (рис. 2 В, С). Наименее дифференцированными

являются клетки 1-го типа, а наиболее – клетки 3-го типа, что подтверждается усложнением ультраструктурной организации клеток по направлению от клеток 1-го типа к клеткам 3-го типа. В цитоплазме более дифференцированных клеток 2-го и 3-го типов отмечаются морфологические признаки повышения синтетической активности: увеличивается протяженность цистерн шероховатого ЭПР, в их полости накапливается тонкогранулярный материал, электронная плотность которого несколько выше, чем плотность цитоплазмы. По мере дифференцировки клеток нарастает количество элементов аппарата Гольджи, усложняется его организация. На срезах наблюдается формирование пузырьков с гомогенным (в отличие от зернистого содержимого цистерн ЭПР) содержимым низкой электронной плотности. Многочисленные гладкомембранные и «опушенные» везикулы в зоне аппарата Гольджи свидетельствуют об интенсивном внутриклеточном транспорте компонентов, синтезируемых в этом органоиде, а также об активных процессах гликозилирования, которые свойственны хондробластам. Лизосомальные структуры в хондробластах первого пассажа немногочисленны.

Таким образом, клетки первичной культуры фетальных хондробластов человека на 1-ом пассаже представляют собой популяцию активно дифференцирующихся клеток с признаками нарастающей синтетической активности. Клетки всех типов синтезируют специфические биополимеры хрящевой ткани – сульфатированные и несulfатированные ГАГ, а также коллаген II типа, выявляющийся при постановке иммунохимической реакции с вторичными антителами. Цитохимические свойства позволяют определить три типа клеток как низкодифференцированные, среднедифференцированные и высокодифференцированные хондробласты.

Первичная культура клеток на 2-ом пассаже образует равномерный плотный монослой, сформированный тремя типами клеток. Морфометрический анализ выявил изменение соотношения между клетками трех типов: содержание 1-го типа снизилось до 59,21%, а содержание клеток 2-го и 3-го типов возросло до 34,06% и 6,73%, соответственно. Морфология клеток 1-го и 3-го третьего типов не отличалась от таковой на 1-ом пассаже.

Клетки 2-го типа на светооптическом уровне имеют овальную форму и ядро, в большинстве случаев бобовидной формы, как правило, смещенное к одному из полюсов клетки. Ядро неравномерно окрашивается гематоксилином, что особенно заметно в суспензии снятых со стекла клеток. Цитоплазма содержит гранулярные структуры, которые также неравномерно окрашиваются гематоксилином. Характерным признаком является присутствие клеток 2-го типа, как с фигурами митоза, так и с фрагментированным ядром, сморщенной и неравномерно окрашенной цитоплазмой.

Реакция на гликоген и гликопротеины в клетках 2-го и 3-го типов выявила гранулярное интенсивно окрашенное реактивом Шиффа вещество, заполняющее весь объем цитоплазмы. Гранулы ШИК-положительного вещества в цитоплазме клеток 3-го типа крупнее, чем в клетках 2-го типа. Обработка срезов амилазой значительно снижает интенсивность ШИК-реакции. В цитоплазме клеток 2-го и 3-го типов при окрашивании альциановым синим на кислые ГАГ выявляются крупные гранулы альцианопозитивного вещества, диффузно расположенные в цитоплазме. При реакции с толуидиновым синим на КС в клетках 2-го и 3-го типов по периферии клеток выявляются крупные интенсивно окрашенные в синий цвет гранулы. Крупные гранулы ХС сливаются и заполняют всю цитоплазму.

Ультраструктура основной части клеток 2-го пассажа свидетельствует об активных процессах синтеза белка и его процессинга: ядро содержит большое количество хроматина и крупное ядрышко; клетки имеют хорошо развитую систему цистерн ЭПР и аппарат Гольджи с большим количеством транспортных везикул. В околоядерной зоне многих клеток накапливаются небольшие секреторные гранулы средней электронной плотности. По сравнению с клетками 1-го пассажа, нарастает степень расширения цистерн ЭПР, переполненных секреторным продуктом. Площадь полей гликогена варьирует в разных клетках, включения гликогена могут занимать до четверти площади цитоплазмы. Часть клеток содержит жировые включения.

Характерной особенностью первичной культуры клеток 2-го пассажа является формирование межклеточного вещества. Между клетками и на поверхности монослоя альциановым синим выявляются кислые ГАГ в виде гомогенного, бесструктурного вещества. Иммунохимическая реакция выявляет присутствие коллагена II типа в межклеточном веществе.

Первичная культура клеток на 3-ем пассаже представлена теми же типами клеток, однако меняется характер её роста: в монослое формируются «острова» плотного роста. Центр «острова» образован плотно прилежащими клетками всех трех типов, а по периферии расположены клетки 3-го типа. Морфометрический анализ выявил дальнейшее снижение содержания клеток 1-го типа (3,11%) и увеличение содержания клеток 3-го типа (37,15%) по сравнению с предыдущим пассажем. Содержание клеток 2-го типа составило 59,74%.

Наблюдаемый на 3-ем пассаже резкий рост числа средне- и высокодифференцированных хондробластов происходит главным образом за счет дифференцировки клеток 1-го и 2-го типов. Высокодифференцированные клетки 3-го типа доминируют. На светооптическом уровне они определяются как самые крупные клетки с большим количеством отростков, обычно расположенные обособленно. Морфологически они представляют собой зрелые, функционально активные клетки. Вероятно, находясь даже не в составе ткани, а в культуре клеток, зрелые хондробласты секреторируют

продукты специфического синтеза и обособляются друг от друга, реализуя генетическую программу формирования межклеточного матрикса. На препаратах, окрашенных ализановым синим, отчетливо видно, как секретлируемые единичные гранулы кислых ГАГ скапливаются на поверхности монослоя, а затем, сливаясь между собой, формируют обильный матрикс.

Ультраструктурное исследование показало, что для высокодифференцированных хондробластов характерны процессы интенсивного синтеза. Их цитоплазма содержит многочисленные профили шероховатого и гладкого ЭПР. Зона комплекса Гольджи расширена, в цитоплазме наблюдается большое количество окаймленных везикул, осуществляющих транспорт макромолекул. Синтезируемые белки поступают в цистерны аппарата Гольджи и гликозилируются. В аппарате Гольджи происходит окончательное формирование молекул гликопротеинов и протеогликанов (Russtill J., 2003; Sacher M., 2007). Гиперфункция ЭПР в хондробластах высокой степени дифференцировки отражает синтез специфического белка (коллагена II типа), выявляемого иммунохимически. Таким образом, культура клеток на третьем пассаже характеризуется минимальным содержанием низкодифференцированных хондробластов. Отличительной чертой данного пассажа является то, что монослой на 97% представлен высокоактивными клетками, формирующими хорошо выраженный матрикс хрящевой ткани *in vitro*.

Культура клеток на 4-ом пассаже формирует плотный монослой, в котором выявляются локусы округлой формы. Клеточная популяция представлена теми же типами клеток, что и на предыдущих пассажах, однако меняется их соотношение – содержание клеток 1-го типа составляет всего 1,12% от общего количества клеток. Отмечается снижение количества клеток 3-го типа до 11,83%. Основную долю клеток на данном пассаже составляют клетки 2-го типа (87,05%). Морфофункциональные характеристики этих клеток аналогичны таковым на предыдущих пассажах и соответствуют хондробластам средней степени дифференцировки.

На 4-ом пассаже не наблюдается обильного матрикса, присущего культуре клеток 3-го пассажа. Популяция клеток 4-го пассажа на ультраструктурном уровне характеризуется преобладанием клеток, содержащих расширенные цистерны ЭПР, секреторные гранулы и лизосомные структуры. В клетках наблюдаются признаки угасания синтетической активности – сокращение площади и количества транспортных везикул, вакуолизация аппарата Гольджи. В цитоплазме появляются электронно-прозрачные участки и вакуоли, отражающие нарушение водно-ионного равновесия, а также многочисленные включения липидов, являющиеся одним из признаков «старения» клеток. Срезы содержат большое количество разрушающихся клеток и клеточный детрит.

Характерным признаком 4-го пассажа является появление округлых локусов, в центре которых локализируются участки гомогенного оксифильного вещества, по периферии – интенсивно базофильный матрикс с клетками. Такие локусы имеют вид «узелков» и ограничены от монослоя мелкими клетками с гиперхромным ядром. Базофильный матрикс на периферии «узелков» и оксифильный матрикс в его центральной части проявляют тинкториальные свойства, схожие с хрящевой тканью *in vivo* в зоне остеогенеза. Это позволяет предположить, что формирование «узелков» отражает завершающий этап дифференцировки клеток *in vitro* – их кальцификацию. Процесс кальцификации хряща генетически детерминирован и связан с изменением метаболизма хрящевых клеток, в частности, синтезом ими матриксных везикул, содержащих щелочную фосфатазу.

Проведенное исследование показало, что первичная культура клеток, полученная из хрящевых тел позвонков плодов человека на сроке 12 недель гестации состоит из хондробластов. На 1-ом пассаже культура главным образом представлена низкодифференцированными малоактивными хондробластами. Вероятно, это объясняется тем, что большая часть средне- и высокодифференцированных хондробластов разрушается при выделении из нативного фетального хряща. Далее, от пассажа к пассажи, снижается содержание низкодифференцированных клеток, накапливаются хондробласты, находящиеся на среднем и высоком уровне дифференцировки. На 3-ем пассаже увеличиваются синтез и секреция в культуральную среду основных биополимеров, происходит формирование матрикса, что характерно для клеток зоны созревания в нативной пластинке роста. На 4-ом пассаже в монослое хондробластов формируются «узелки», и этот процесс напоминает оксификацию хрящевого матрикса в зоне энхондрального остеогенеза *in vivo*.

Согласно современным представлениям о дифференциальной активности генов, можно предположить, что особенности клеточного состава на каждом из пассажей связаны с тем, что в каждом конкретном типе клеток функционирует свойственный только этому типу набор экспрессирующихся генов. Благодаря их функционированию обеспечиваются закономерные пролиферация и дифференцировка хондробластов в динамике пассажей *in vitro*, которые, хотя и в упрощенном виде, но все же воспроизводят основные этапы развития хондробластов фетальной пластинки роста *in vivo* – от момента их образования и до завершения жизненного цикла.

Полученные данные о структурно-функциональных особенностях хондробластов в динамике их культивирования указывают на сохранение клетками специфической морфологии и функций *in vitro*. Данный факт позволяет говорить не только о возможности использования клеток первичной культуры в качестве донорского материала, но и об использовании первичной культуры фетальных хондробластов в качестве экспериментальной модели для изучения дифференцировки хондробластов фетальной пластинки

роста человека, оценки влияния поражающих факторов и эффективности применения лекарственных средств.

Проведенное исследование позволяет сформулировать критерии оптимального выбора клеточного материала с целью использования первичной культуры фетальных хондробластов для создания тканеинженерных конструкций. Клеточная популяция, предназначенная для трансплантации, должна обеспечивать репаративную регенерацию поврежденного хряща, как за счет репродукции клеток, так и синтеза компонентов матрикса. В этом плане наиболее подходящей для создания тканеинженерных конструкций является клеточная популяция хондробластов 2-го пассажа. Это объясняется оптимальным соотношением низко-, средне- и высокодифференцированных клеток. При этом низкодифференцированные клетки с высокой пролиферативной активностью способны заполнить хрящевой дефект, средне- и высокодифференцированные хондробласты — заполнить дефект матриксом. Использование хондробластов первичной культуры 3-го и 4-го пассажей для тканеинженерных конструкций нецелесообразно, поскольку их популяция представлена в основном высокодифференцированными клетками, которые менее резистентны к изменению факторов окружающей среды, более подвержены повреждению и гибели.

4. Морфофункциональная характеристика посттравматического регенерата суставного хряща крысы при трансплантации фетальных хондробластов человека

Для проверки концепции выбора оптимального клеточного материала для тканевой инженерии в эксперименте на лабораторных животных была проведена ксенотрансплантация первичной культуры фетальных хондробластов человека второго пассажа в дефект суставного хряща дистального эпифиза бедренной кости крыс.

У крыс, не получавших лечебного воздействия, на 60-е сутки после нанесения повреждения макроскопически отчетливо заметен дефект суставного хряща, который имеет овальную форму и располагается в межмышцелковой ямке в виде кратерообразного углубления. На светомикроскопическом уровне четко идентифицируются границы опила суставного хряща и сформировавшийся регенерат. Края опила неровные, покрыты плотной неоформленной волокнистой соединительной тканью. Величина диастаза составляет $3,89 \pm 0,35$ мм. Следует отметить, что регенерат заполняет не весь дефект и имеет вид конуса, вершина которого выступает за пределы суставной поверхности. Его центральные отделы выполнены фиброретикулярной тканью, в которой выявляются формирующиеся примитивные костные балки. В более глубоких отделах регенерата по

направлению ко дну ложа дефекта наблюдаются многочисленные кровеносные сосуды, вокруг которых заметны признаки активного остеогенеза.

У крыс, дефект суставного хряща которых заполняли хитозановым гелем, на 60-е сутки отчетливо заметна область регенерата, который расположен в межмышцелковой ямке, имеет овальную форму, однородный, белого цвета. При гистологическом исследовании границы опиала суставного хряща не имеют четких контуров. Величина диастаза между краями раны составляет $3,39 \pm 0,37$ мм. Регенерат выполнен плотной неоформленной волокнистой тканью. На препаратах отчетливо заметно, как со стороны субхондральной костной пластинки по направлению к суставной поверхности происходит инвазия регенерата кровеносными сосудами и выселение малодифференцированных клеток из губчатой кости эпифиза.

У крыс, которым согласно протоколу эксперимента производили стандартный дефект, после чего вносили первичную культуру фетальных хондробластов с хитозановым гелем, на 60-е сутки наблюдения заметен регенерат, имеющий неоднородное строение и характеризующийся наличием темных и более светлых участков. При гистологическом исследовании видно, что сформировавшийся регенерат полностью заполняет дефект. Величина диастаза между краями раны составляет $2,61 \pm 0,23$ мм и не имеет достоверных отличий от диаметра инструмента, которым наносился дефект. В области торцевых участков опиала суставного хряща локализуются многочисленные группы из 4-8 клеток, основное вещество вокруг которых характеризуется интенсивной альцианпозитивной реакцией. Можно предполагать, что широкий слой матрикса гиалинового хряща, который определяется на границе регенерата и опиала суставного хряща, формируется благодаря активному синтезу протеогликанов дифференцированными хондробластами донора, а также хондроцитами реципиента. Это позволяет заключить, что в основе регенерации лежит функциональная активность не только клеток донора, но и клеток реципиента.

Регенерат в полости дефекта образует конус роста, вершина которого граничит с субхондральной костной пластинкой, а основание обращено к суставной поверхности. Его центральная зона представлена низкодифференцированными пролиферирующими клетками; более дифференцированные клетки располагаются на периферии. В основании регенерата отмечаются признаки формирования типичных для нативного суставного хряща слоев. Со стороны суставной поверхности регенерат покрыт гомогенным интенсивно альцианпозитивным веществом. Клетки формирующегося тангенциального слоя овальной формы, их цитоплазма хорошо выражена, умеренно окрашивается гематоксилином. Плоскость расположения клеток параллельна суставной поверхности.

В более глубоких слоях регенерата хондробласты принимают овальную форму. Следует отметить, что изменяется плоскость расположения клеток – последние выстраиваются в колонки перпендикулярно суставной поверхности, как в препаратах нативного суставного хряща. Клетки регенерата, расположенные на границе с субхондральной костной пластинкой, не имеют признаков деструкции. В их цитоплазме, территориальном и межтерриториальном матриксе гистохимически определяется высокое содержание суммарных кислых ГАГ.

Таким образом, трансплантированные в дефект суставного хряща крысы фетальные хондробласты человека сохраняют функциональную активность в течение 60 суток, обеспечивая заполнение дефекта хрящевой тканью. Важной характеристикой трансплантата является отсутствие признаков воспалительной реакции в его толще и в окружающей ткани. Вероятно, это обусловлено снижением иммуногенности ксенотрансплантата за счет очищения культуры хондробластов в процессе культивирования от лейкоцитов-пассажиров (ко-стимуляторов иммунного ответа), а также низким уровнем экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости фетальными хондробластами. Очевидно, положительную роль играет также использование в качестве иммуномеханического барьера хитозанового геля, который отграничивает организм реципиента от трансплантата, обеспечивает сохранение жизнедеятельности инкапсулированных клеток и не препятствует диффузии образующихся в клетках биологических веществ. По данным Hsu S. (2004), Lee J.E. (2004), хитозановый гель выполняет и поддерживает объем дефекта, имеет хорошие показатели биосовместимости, блокирует синтез медиаторов воспаления, подавляет разрушительное действие свободнорадикальных соединений на межклеточный матрикс и снижает активность протеолитических ферментов. Следует отметить, что формированию органотипического регенерата способствовала и использованная при трансплантации малотравматичная техника оперативного вмешательства на коленном суставе. Сохранение подвижности сустава с первых часов послеоперационного периода может быть одним из существенных факторов, оказывающих положительное влияние на последовательную дифференцировку клеток суставного хряща.

Проведенное исследование показывает, что использование при ксенотрансплантации тканеинженерной конструкции на основе первичной культуры фетальных хондробластов человека второго пассажа и хитозанового геля не вызывает острого иммунного отторжения и в течение 60 суток обеспечивает формирование органотипического регенерата за счет пролиферации и дифференцировки фетальных хондробластов донора и их интеграции с тканью реципиента.

ВЫВОДЫ

1. Структурно-функциональная организация зоны роста тела позвонка человека на 12-й неделе гестации схожа с таковой у свиньи на 6-й неделе гестации; пластинка роста тела позвонка у человека в 1 год, 3-7 лет, 11 лет, 12-14 лет постнатального периода онтогенеза имеет схожие характеристики с пластинкой роста свиньи на 8, 12 неделе гестации, 7-20, 30-40 суток постнатального периода онтогенеза соответственно.
2. Увеличение степени дифференцировки клеток и пространственно-упорядоченной организации межклеточного вещества хрящевой ткани в переднем отделе пластинки роста тела позвонка человека и в вентральном отделе пластинки роста тела позвонка свиньи является возрастной особенностью и определяет асимметрию роста тела позвонка грудного отдела у данных видов млекопитающих в пренатальном и раннем постнатальном периодах онтогенеза.
3. В период гисто-топографической структуризации пластинки роста тела позвонка деструкция хрящевого матрикса и апоптоз хондробластов зоны пролиферации опосредуются повышенной генерацией активированных кислородных метаболитов эндотелиальными клетками кровеносных сосудов и хондробластами провизорной хрящевой ткани.
4. Первичная культура фетальных хондробластов, выделенных из зоны роста тела позвонка плода человека на 12-ой неделе гестации может служить экспериментальной моделью для изучения закономерностей дифференцировки хондробластов фетальной пластинки роста человека *in vitro* и изучения различных воздействий на хрящевую ткань пластинки роста тела позвонка.
5. Оптимальными сроками забора донорской хрящевой ткани для её использования в клеточных технологиях являются 12 недель гестации у человека и 6 недель гестации у свиньи.
6. Морфологическим критерием при определении оптимального пассажа первичной культуры с целью создания тканеинженерных конструкций является процентное содержание клеток низкой, средней и высокой степени дифференцировки.
7. Трансплантация клеток первичной культуры фетальных хондробластов человека в дефект суставного хряща крысы не вызывает острого иммунного отторжения, приводит к интеграции клеток человека с хрящевой тканью крысы и формированию тканеспецифического регенерата.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные о закономерностях морфогенеза пластинки роста тела позвонка человека и свиньи являются фундаментальными и рекомендуются для использования в учебном процессе в высших учебных учреждениях ветеринарного и медико-биологического профиля при преподавании сравнительной морфологии человека и животных, дисциплин «Гистология, эмбриология, клеточная биология», «Анатомия» в разделах «Опорно-трофические ткани», «Опорно-двигательный аппарат», «Индивидуальное развитие организмов», «Биология свиньи».
2. Данные о возрастных особенностях формирования пластинки роста тела позвонка человека и свиньи в онтогенезе уточняют сроки терминационных тератогенных периодов в отношении пластинки роста тела позвонка и рекомендуются для использования в практической работе специализированных свиноводческих предприятий по выращиванию поросят, медицинских перинатальных центров.
3. Полученные сведения в отношении оптимального срока получения донорской хрящевой ткани из пластинки роста тела позвонка человека и свиньи, а также критериев выбора оптимального пассажа первичной культуры фетальных хондробластов для трансплантации рекомендуется использовать при разработке тканеинженерных конструкций с целью замещения дефектов суставного хряща.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сахаров, А.В. Возрастные особенности развития позвоночника экспериментальных животных в пренатальном онтогенезе / А.В. Сахаров, А.М. Зайдман // Матер. VI Междунар. симпоз., VII Чуйской науч.-практ. конф. – Чолпон-Ата, 2003 – Т.1. – С.252-254.
2. Зайдман, А.М. Культура хондробластов как потенциальный источник для тканевой инженерии при повреждениях и заболеваниях позвоночника / А.М. Зайдман, А.В. Сахаров, Т.Д. Колокольцова // Хирургия позвоночника. – 2004. – № 4. – С. 115-121.
3. Зайдман, А.М. Морфофункциональная характеристика культуры эмбриональных хондробластов человека как перспективного источника клеточного материала для замещения дефектов хрящевой ткани / А.М. Зайдман, А.В. Корель, А.В. Сахаров // Материалы Междунар. конф. «Клинические и фундаментальные проблемы клеточных биотехнологий». – Новосибирск, 2005 – С. 60-61.

4. Зайдман, А.М. Первичная культура хондробластов человека – как возможный донорский материал для коррекции нарушений хрящевой ткани / А.М. Зайдман, А.В. Сахаров, А.В. Корель, И.Г. Ким, Т.Д. Колокольцева // *Материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвященной 70-летию Новосибирского государственного медицинского университета. «Инновационные технологии в эстетической медицине и пластической хирургии».* – Новосибирск, 2005. – С. 16-18.
5. Зайдман, А.М. Строение пластинки роста тела позвонка у детей различного возраста / А.М. Зайдман, А.В. Корель, А.В. Сахаров // *Морфология.* – 2005. – №4. – С. 51-55.
6. Сахаров, А.В. Культура хондробластов человека как возможный донорский материал для коррекции поражения хрящевой ткани Сахаров А.В., Зайдман А.М., Корель А.В. и др. // *Материалы III Всерос. съезда по трансплантологии и искусственным органам 28-30 октября 2005 г. / Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2005. – №3. – С. 59-60.
7. Зайдман, А.М. Регуляция метаболизма провизорного хряща пластинок роста тел позвонков в периоды формирования роста / А.М. Зайдман, А.В. Корель, А.В. Сахаров, М.В. Михайловский // *Материалы VIII съезда травматологов-ортопедов России «Травматология и ортопедия XXI века».* – Самара, 2006. – С.688-689
8. Зайдман, А.М. Первичная культура хондробластов человека как модель для изучения дифференцировки хондробластов пластинки роста *in vitro* / А.М. Зайдман, А.В. Сахаров, А.В. Корель, И.Г. Ким, Т.Д. Колокольцева, Е.И. Рябчикова // *Материалы VIII съезда травматологов-ортопедов России «Травматология и ортопедия XXI века».* – Самара, 2006. – С. 1051-1052.
9. Макеев, А.А. Коррекция антиоксидантом тиофаном структурно-функциональных нарушений костной ткани / А.А. Макеев, А.В. Сахаров, А.Е. Просенко // *Материалы II Междунар. науч.-практ. конф. Новосибирск 2006.* – С. 194-195.
10. Макеев, А.А. Использование антиоксиданта тиофана для коррекции метаболических нарушений костной ткани тела позвонка свиньи при окислительном стрессе / А.А. Макеев, А.В. Сахаров, К.В. Жучаев // *Материалы V Междунар. науч.-практ. конф. «Современные тенденции развития АПК в России».* Красноярск, 2007. – С. – 323-326.
11. Сахаров, А.В. Изучение морфофункциональных особенностей хондробластов, полученных из пластинки роста тел позвонков человека, при культивировании *in vitro* / А.В. Сахаров, Т.Д. Колокольцева, И. Ким и др. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* – 2007. – № 4. – С. 154-159.
12. Макеев, А.А. Влияние окислительного стресса на состояние костной ткани тела позвонка свиньи / А.А. Макеев, А.В. Сахаров, К.В. Жучаев и др. // *Сиб. вестн. с.-х. науки.* – 2007. – № 6. – С. 82-86.

13. **Макеев, А.А.** Морфофункциональная характеристика пластинки роста тела позвонка млекопитающих в возрастном аспекте / **А.А. Макеев, А.В. Сахаров, О.В. Кеберлайн, М.Б. Пыхтина** // *Материалы V Всерос. науч.-практ. конф. «Проблемы биологической науки и образования в Вузах».* Новосибирск, 24-25 апреля 2008. – С. 110-113.
14. **Макеев, А.А.** Влияние антиоксиданта тиофана на показатели свободно-радикального окисления и активность ферментов антиоксидантной защиты у поросят / **А.А. Макеев, А.В. Сахаров, К.В. Жучаев, А.Е. Просенко** // *Материалы Сибирской Межрегион. науч.-практ. конф. «Адаптация, здоровье и продуктивность животных».* Новосибирск, 22-23 мая 2008. – С. 141-144.
15. **Сахаров, А.В.** Использование первичной культуры фетальных хондробластов человека для ксенотрансплантации в дефект суставного хряща крыс / **А.В. Сахаров, А.А. Макеев, А.В. Ефремов** и др. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* – 2008. – № 3. – С. 136-140.
16. **Макеев, А.А.** Применение антиоксиданта тиофана для коррекции морфофункциональных нарушений в костной ткани свиньи при окислительном стрессе / **А.А. Макеев, А.В. Сахаров, К.В. Жучаев, А.Е. Просенко** // *Вестник Новосибирского аграрного университета.* –2008. – № 7. – С. 123-126.
17. **Сахаров, А.В.** Особенности формирования осевого скелета свиньи в пренатальном периоде онтогенеза / **А.В. Сахаров, А.А. Макеев** // *Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Роль биологии и ветеринарной медицины в реализации национального проекта «Развитие АПК на 2008-2012 гг»».* Оренбург, 21-23 октября 2008. – С. 146-151.
18. **Сахаров, А.В.** Морфологические критерии выбора клеток первичной культуры фетальных хондробластов для тканеинженерных конструкций / **А.В. Сахаров** // *Материалы Всерос. науч. конф. «Интеллект 2008».* Красноярск, 18 декабря 2008. – С. 72-75.
19. **Сахаров, А.В.** Биотехнологические подходы к восстановлению дефектов хрящевой ткани / **А.В. Сахаров** // *Материалы Всерос. науч. конф. «Интеллект 2008».* Красноярск, 18 декабря 2008. – С. 79-83.
20. **Сахаров, А.В.** Нарушение структурно-функциональной организации пластинки роста тела позвонка свиньи при окислительном стрессе / **А.В. Сахаров, А.А. Макеев** // *Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Использование инновационных технологий для решения проблем АПК в современных условиях».* Волгоград, 27-29 января 2009. – С. 145-149.
21. **Сахаров, А.В.** Периодизация роста осевого скелета свиньи в онтогенезе / **А.В. Сахаров, А.А. Макеев** // *Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Использование инновационных технологий для решения проблем АПК в современных условиях».* Волгоград, 27-29 января 2009. – С. 149-153.
22. **Сахаров, А.В.** Морфофункциональная характеристика первичной культуры клеток из разных источников локализации хрящевой ткани / **А.В.**

- Сахаров // Материалы III Междунар. науч.-практ. конф. «Вклад ученых в реализацию приоритетного национального проекта «Развитие агропромышленного комплекса»». Троицк, 25-27 ноября 2008. – С. 77-81.
23. Сахаров, А.В. Модель для изучения биологии провизорного хряща пластинки роста *in vitro* / А.В. Сахаров // Материалы III Междунар. науч.-практ. конф. «Вклад ученых в реализацию приоритетного национального проекта «Развитие агропромышленного комплекса»». Троицк, 25-27 ноября 2008. – С. 93-97.
24. Сахаров, А.В. Влияние активных кислородных метаболитов на структуризацию пластинки роста тела позвонка / А.В. Сахаров // Материалы III Междунар. науч.-практ. конф. «Образование и здоровье, экономические, медицинские и социальные проблемы». Пенза, 18 декабря, 2008. – С. 83-85.
25. Сахаров, А.В. Коррекция антиоксидантом тиофаном структурно-функциональных нарушений пластинки роста тела позвонка при окислительном стрессе / А.В. Сахаров, А.А. Макеев // Материалы III Междунар. науч.-практ. конф. «Образование и здоровье, экономические, медицинские и социальные проблемы», Пенза, 18 декабря, 2008. – С. 87-90.
26. Макеев, А.А. Влияние окислительного стресса на морфофункциональное состояние пластинки роста тела позвонка при глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе / А.А. Макеев, А.В. Сахаров, Е.С. Распутина // Сб. науч. работ ученых. Новосибирск, 2006. – Вып. VIII, ч. I. – С. 168-172.
27. Макеев, А.А. Изучение возможности использования антиоксиданта тиофана для коррекции структурно-функциональных нарушений костной ткани / А.А. Макеев, А.В. Сахаров // Сб. науч. работ ученых. Новосибирск, 2006. – Вып. VIII, ч. I. – С.154-160.
28. Макеев, А.А. Использование антиоксиданта тиофана для коррекции метаболических нарушений костной ткани тела позвонка свиньи при окислительном стрессе / А.А. Макеев, А.В. Сахаров, К.В. Жучаев // Матер. междунар. науч.-практ. конф. “Современные тенденции развития АПК в России”. Красноярск, 2007. – С. 323-326.
29. Макеев, А.А. Использование антиоксиданта тиофана для коррекции структурно-функциональных нарушений костной ткани позвонка свиньи при окислительном стрессе / А.А. Макеев, А.В. Сахаров, К.В. Жучаев // Материалы V Междунар. науч.-практ. конф. «Современные тенденции развития АПК в России», Красноярск, 2007. – С. 323-326.
30. Макеев, А.А. Морфофункциональная организация костной ткани тела позвонка свиньи в условиях окислительного стресса и при использовании антиоксиданта тиофана / А.А. Макеев, А.В. Сахаров, К.В. Жучаев // Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Развитие АПК», Москва, 2007. – ч. II. – С. 265-268.
31. Макеев, А.А. Влияние окислительного стресса на энхондральный остеогенез в период полового созревания / А.А. Макеев, А.В. Сахаров, Е.К.

- Акинина // Материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Инновационные процессы в области химикопедагогического и естественнонаучного образования». Оренбург, 2008. – С. 92-94.
32. Сахаров, А.В. Морфологические критерии периодизации роста осевого скелета свиньи / А.В. Сахаров // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 1. – С. 104-107.
33. Сахаров, А.В. Возрастные особенности развития позвоночника свиньи в онтогенезе / А.В. Сахаров, // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 3. – С. 115-119.
34. Сахаров, А.В. Влияние окислительного стресса на энхондральный остеогенез в зоне роста тела позвонка / А.В. Сахаров // Материалы IX Сибирской ветеринарной конф. «Актуальные вопр. вет. медицины». Новосибирск, 2009. – С. 88-90.
35. Сахаров, А.В. Обоснование выбора оптимального клеточного материала для тканеинженерных конструкций / А.В. Сахаров // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 3. – С. 122-126.
36. Сахаров, А.В. Общие закономерности развития позвоночника человека и свиньи в онтогенезе / А.В. Сахаров, А.А. Макеев, Е.И. Рябчикова // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 3. – С.126-129.
37. Сахаров, А.В. Нарушение формирования осевого скелета свиньи при окислительном стрессе / А.В. Сахаров, А.А. Макеев, К.В. Жучаев и др. // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2009. – № 4. – С. 41-45.
38. Макеев, А.А. Влияние активированных кислородных метаболитов на структуризацию пластинки роста тела позвонка свиньи / А.А. Макеев, А.В. Сахаров // Матер. VII Межрегион. конф. ученых СФО. Новосибирск, 2009. – С. 172-175.
39. Сахаров, А.В. Активность свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты у поросят в постнатальном периоде онтогенеза / А.В. Сахаров, А.А. Макеев, А.Е. Просенко, Е.И. Рябчикова // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 4. – С.167-169.
40. Сахаров, А.В. Роль активированных кислородных метаболитов в структуризации пластинки роста / А.В. Сахаров, А.А. Макеев, А.Е. Просенко, Е.И. Рябчикова // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 5. – С.99-102.

Подписано к печати 20.03.2009 г. Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 2,0.
Тир. 100 экз. Заказ 387

Отпечатано в копировальном центре НГАУ г. Новосибирск,
ул. Никитина, 155, к. 208б