

Морфологические особенности грануляционной ткани, формирующейся при чрескостном остеосинтезе и воздействии лазерного излучения

Ю.М. Ирьянов, Т.Ю. Ирьянова, О.В. Дюрягина, В.Н. Ирьянова

Characteristic morphological features of the granulation tissue being formed during transosseous osteosynthesis and under laser radiation influence

Yu. M. Irianov, T.Yu. Irianova, O.V. Duriagina, V.N. Irianova

Федеральное государственное учреждение «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, г. Курган (директор — доктор медицинских наук А.В. Губин)

В эксперименте на половозрелых линейных крысах при помощи методов световой и электронной микроскопии и морфометрии исследовано влияние импульсного инфракрасного лазерного излучения в терапевтическом режиме на грануляционную ткань, формирующуюся в костномозговой полости при заживлении перелома большеберцовой кости в условиях чрескостного остеосинтеза. Отмечены уменьшение воспаления, увеличение объема грануляционной ткани, активизация фибриллогенеза и репаративного интрамурального ангиогенеза. Под действием лазера усиливается пролиферация эндотелиоцитов и перицитов, образуются сосудистые почки роста, эндотелиальные выросты и эндовазальные разрастания, локализующиеся в просвете сосудов и в интрамуральных каналах. Впервые выявлен характерный поверхностный микрорельеф эндовазальных разрастаний, образованный черепицеобразно расположенными перицитами. В результате интенсивного капиллярообразования количество сосудов в единице площади среза грануляционной ткани в опыте достоверно увеличивается, а диаметр просвета сосудов уменьшается по сравнению с контролем. Полученные данные являются основанием для проведения дальнейших исследований в этом направлении с целью разработки клинических рекомендаций по стимуляции ангиогенеза и использования прогениторных клеток грануляционной ткани костномозговой полости в клеточных технологиях.

Ключевые слова: грануляционная ткань, чрескостный остеосинтез, инфракрасный лазер, интрамуральный ангиогенез, клеточные технологии.

The effect of laser impulse infrared radiation of therapeutic mode on the granulation tissue formed in the medullary cavity during tibial fracture healing under transosseous osteosynthesis has been studied experimentally in mature linear rats by the methods of light and electron microscopy and morphometry. The reduction of inflammation, the increase of granulation tissue volume, the activation of fibrillogenesis and reparative intramural angiogenesis have been noted. Under laser influence the proliferation of endotheliocytes and pericytes increases, growth vascular buds are formed, as well as endothelial growths and endovasal spreads are formed, localizing in vascular lumens and intramural canals. The characteristic superficial microrelief of endovasal spreads, formed by pericytes of tiled-like arrangement, has been revealed for the first time. As a result of intense formation of capillaries the number of vessels per unit of granulation tissue section area in the experiment increases significantly, while the diameter of vascular lumen decreases in comparison with control. The data obtained are a reason to perform further studies of this kind for the purpose of developing the clinical guidelines on angiogenesis stimulation and using the progenitor cells of medullary cavity granulation tissue for cell technologies.

Keywords: granulation tissue, transosseous osteosynthesis, infrared laser, intramural angiogenesis, cell technologies.

Лазерные и клеточные технологии все более широко применяются в таких высокотехнологичных областях медицины, как травматология и ортопедия, сердечно-сосудистая хирургия, нейрохирургия, косметология, нефрология [1, 2, 5, 6]. Стволовые и прогениторные клетки костного мозга используются для лечения ишемии конечностей, ожоговых повреждений кожи, хрящевых дефектов, трофических язв, свищей, ран разной этиологии, инфаркта миокарда, почечной недостаточности, травм спинного и головного мозга [8, 9, 12]. Активно развиваются клеточные технологии, основанные на использовании в клинических целях «взрослых» стволовых клеток костного мозга, жировой ткани, пу-

повинной, плацентарной и периферической крови [7, 10, 11, 13]. Грануляционная ткань, формирующаяся в костномозговой полости при заживлении костных ран, в качестве одного из возможных источников мультипотентных мезенхимальных клеток не рассматривалась, хотя она представляет особый интерес в связи с тем, что предшественниками большинства макрофагов и фибробластов в очаге воспаления и заживления ран являются прогениторные клетки костного мозга [3]. Сведения о действии лазерного излучения на структуры костного мозга единичны и касаются преимущественно влияния гелий-неонового лазера. Грануляционная ткань, формирующаяся при заживлении костных ран в условиях чреско-

стного остеосинтеза и воздействия лазерного излучения, исследована недостаточно. Цель работы – анализ морфологических особенностей грануляционной ткани, формирующейся при за-

живлении перелома кости в условиях чрескостного остеосинтеза и воздействия низкоэнергетического импульсного инфракрасного лазерного излучения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 10 половозрелых крысах линии Вистар в контрольной и опытной группах (по 5 животных в каждой группе). Условия содержания и кормления животных соответствовали «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник», утвержденным Приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.83 г. Экспериментальные исследования выполнялись с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Report of the AVMA Panel on Euthanasia JAVMA, 2001).

Под общей анестезией у крыс моделировали закрытый перелом большеберцовой кости в области средней трети диафиза и проводили операцию чрескостного остеосинтеза, используя разработанное нами устройство (рис. 1). Рентгеновский контроль осуществляли аппаратом АРД-2 (рис. 2). Животных опытной группы через 1 сутки после операции подвергали воздействию импульсного инфракрасного лазерного излучения на лазерном терапевтическом аппарате «Узор-А-2К» (длина волны $0,89 \pm 0,02$ мкм, частота импульсов 150 Гц, мощность - 4 Вт). На зону перелома и затылочно-теменную область накожно проводили 3 сеанса облучения по 5 минут через 1 сутки. Крысы, оперированные, но не подвергавшиеся воздействию лазерного излучения, служили контролем.

Через 7 суток после операции животных опытной и контрольной групп эвтаназировали. Оперированные большеберцовые кости фиксировали в 2% растворе параформальдегида и глутаральдегида, декальцинировали и заливали в парафин. Продольные срезы толщиной 4-6 мкм окрашивали гематоксилином-эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. Часть материала исследовали в сканирующем электронном микроскопе JSM-840 (Япония). Для морфофункциональной оценки сосудистого русла грануляционной ткани на сканирующих электронограммах при инструментальном увеличении 1000 в единице площади среза

0,01 мм² определяли количество сосудов и средний диаметр их просвета. Количественные данные подвергали статистической обработке с использованием пакета статистических программ «Microsoft Office Excel 2003».



Рис. 1. Устройство для чрескостного остеосинтеза на голени крысы

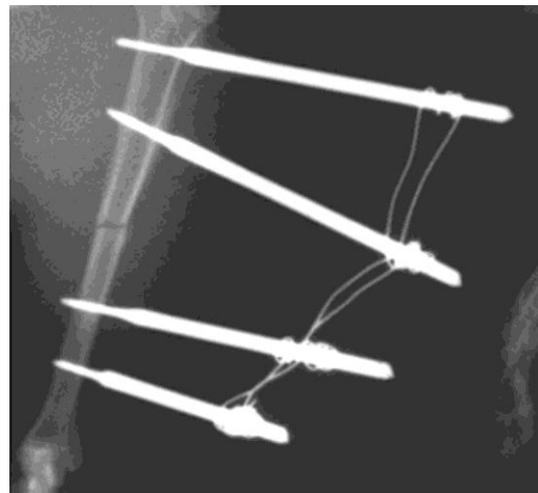


Рис. 2. Контрольная рентгенограмма голени крысы сразу после перелома большеберцовой кости и операции чрескостного остеосинтеза

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У контрольных животных через 7 суток после операции в костной ране отмечается воспалительная реакция с формированием инфильтрата, представленного преимущественно нейтрофильными элементами, лимфоцитами и макрофагами. В интермедиарных зонах регенерата располагаются лейкоцитарно-некротические массы, содержащие лизированные клетки, волокна и пласты фибрина. Большинство нейтрофильных лейкоцитов в этой области находится в состоянии лейкоклазии. В

просветах сосудов содержатся преимущественно эритроциты и единичные лейкоциты. Отмечается слабовыраженный лейкодиapedез. В эндостальных и центральных участках костномозговой полости, примыкающих к области перелома, формируется грануляционная ткань, в которой располагаются расширенные неправильной формы фестончатые капилляры синусоидного типа с неравномерным кровенаполнением, диаметр которых существенно превышает диаметр обычных капил-

ляров. Стенка новообразованных капилляров утолщена, отечна, пропитана плазмой крови. На отдельных участках выявляются микроциркуляторные расстройства, такие как эритростаз, лейкостаз, микротромбоз, периваскулярный отек (рис. 3). В центральных участках костномозговой полости в зоне перелома отмечается незначительная периваскулярная пролиферация фибробластоподобных клеток, фибрилlogenез и формирование тонких коллагеновых волокон и их пучков, не имеющих какой-либо преимущественной ориентации. Перифибриллярная клеточная реакция выражена слабо. В промежутках между волокнистыми структурами наблюдаются скопления свободно расположенных экстравазальных эритроцитов и выход плазмы крови вследствие повышенной проницаемости стенок сосудов. Количество сосудов в единице площади $0,01 \text{ мм}^2$ грануляционной ткани в контроле составляет $1,65 \pm 0,07$, диаметр просвета сосудов – $42,75 \pm 2,05 \text{ мкм}$.

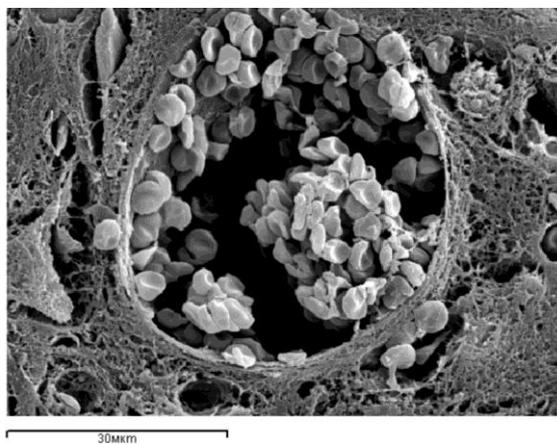


Рис. 3. Грануляционная ткань контрольного животного. Умеренная эктазия синусоида, формирование пристеночных микротромбов, отек периваскулярного пространства, выход из сосудистого русла эритроцитов и лейкоцитов. Периваскулярные клетки единичны. Сканирующая электронная микроскопия

В опытной группе животных в костной ране отмечены морфологические признаки уменьшения воспаления и начала репаративно-резорбтивных процессов. Грануляционная ткань заполняет практически полностью всю поврежденную область костного мозга и разрастается на значительном протяжении в костномозговую полость отломков. При этом в зоне перелома формируется соединительнотканное сращение. В интермедиарных и медуллярных участках регенерата некротический детрит полностью отсутствует. Несмотря на значительное уменьшение общего количества лейкоцитов, вокруг отдельных сосудов выявляются лейкоцитарные муфты, свидетельствующие о сохранении лейкоцитарной активности. В грануляционной ткани располагаются многочисленные группы малодифференцированных клеток, малые и большие круглые, эпителиоидные клетки, большое количество капилляров синусоидного типа, во-

круг которых отмечается выраженная пролиферация перicyтов (рис. 4).

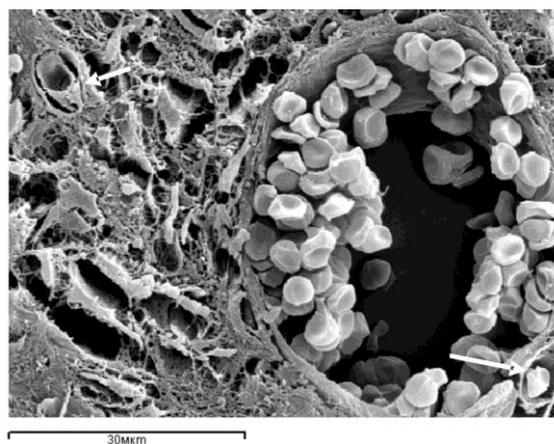


Рис. 4. Грануляционная ткань животного опытной группы. Образование капиллярных почек роста и эндовасальных разрастаний (стрелки). Появление многочисленных периваскулярных эритроцитов. Сканирующая электронная микроскопия

В периваскулярных пространствах грануляционной ткани животных опытной группы наряду с многочисленными макрофагами выявляются фибробластоподобные элементы различной степени дифференцировки – от эпителиоидных до фибробластов и остеобластов с морфологическими признаками высокой функциональной активности, о чем свидетельствует активный фибрилlogenез в перичеллюлярных пространствах. В таких участках выявляется мелкопетлистая фибриллярная сеть и извитые тонкие пучки коллагеновых волокон. Формируются и более толстые пучки волокон, входящих в состав новообразованных костных трабекул, которые разделены инфильтратами из лимфоидных клеток и экстравазальных эритроцитов. В грануляционной ткани встречаются единичные тканевые базофилы, лимфоциты и плазматические клетки. Полиморфноядерные нейтрофилы немногочисленны. Наблюдается пролиферация эндотелиальных клеток, которые формируют сосудистые почки микроциркуляторного русла. Камбиальные клетки грануляционной ткани опытных животных метаболически высоко активны, содержат большие ядра и ядрышки; иногда в них видны фигуры митоза.

Одной из характерных особенностей воздействия инфракрасного лазерного излучения на грануляционную ткань, формирующуюся в костномозговой полости при заживлении перелома в условиях чрескостного остеосинтеза, является выраженная активизация репаративного интрамурального ангиогенеза, о чем свидетельствует интенсивное капиллярообразование и формирование многочисленных эндотелиальных выростов, образующих капиллярные почки и эндовасальные разрастания, локализующиеся в просвете сосудов и в интрамуральных каналах (рис. 5, 6). В результате количество сосудов в единице площади среза гра-

нуляционной ткани в опыте увеличивается до $2,86 \pm 0,15$ ($p < 001$), а диаметр просвета сосудов, напротив, уменьшается до $32,45 \pm 1,51$ мкм ($p < 001$) по сравнению с контролем.

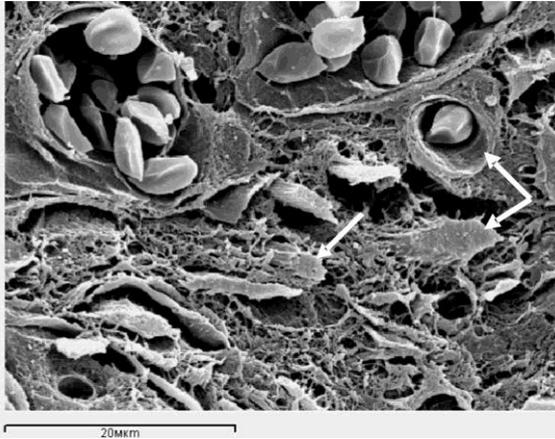


Рис. 5. Грануляционная ткань животного опытной группы. Интенсивный капиллярогенез, появление многочисленных капиллярных и эндотелиальных выростов (стрелки). Сканирующая электронная микроскопия

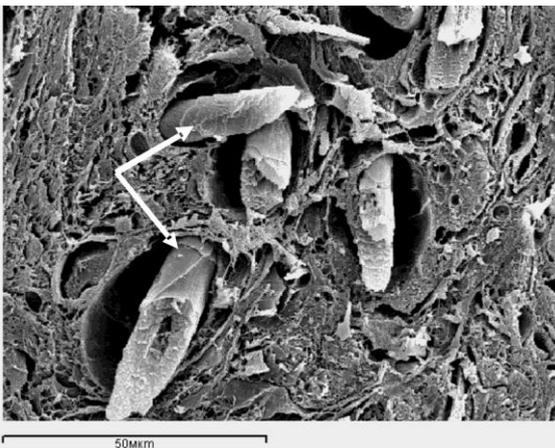


Рис. 6. Участок интрамурального ангиогенеза в грануляционной ткани животного опытной группы. Эндотелиальные выросты (стрелки) в интрамуральных каналах. Сканирующая электронная микроскопия

Эндовазальные разрастания имеют толщину 8-10 мкм и характерный микрорельеф поверхностного слоя (рис. 6, 7), который образован плоскими отростками перицитов, располагающимися по поверхности эндотелиального тяжа черепицеобразно, с ориентацией свободного края клеток к вершине разрастания, что обусловлено хемотакси-

сом и хемотаксисом перицитов [4]. Часть эндовазальных разрастаний канализируется и превращается в капилляры.

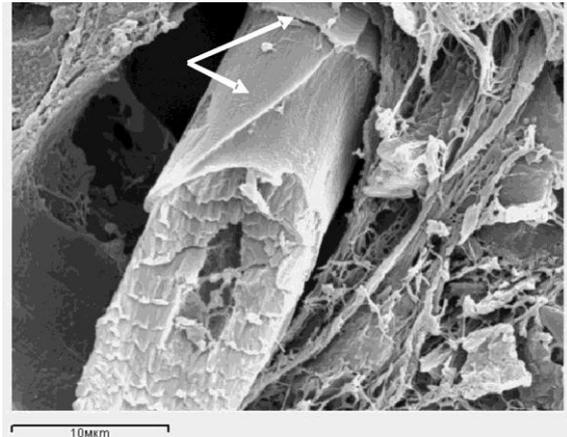


Рис. 7. Канализированный эндотелиальный вырост, окруженный плоскими отростками перицитов (стрелки), которые перекрывают друг друга (черепичное перекрытие) в интрамуральном канале грануляционной ткани опытного животного. Сканирующая электронная микроскопия

Таким образом, локальное воздействие инфракрасного лазерного излучения на зону перелома на ранних этапах чрескостного остеосинтеза вызывает существенные структурные изменения грануляционной ткани, формирующейся в костномозговой полости. Уменьшается воспаление, увеличивается объем регенерата, активизируется фибриллогенез и репаративный интрамуральный ангиогенез. Под действием лазера усиливается пролиферация эндотелиоцитов и перицитов, активизируется образование сосудистых почек, эндотелиальных выростов и эндовазальных разрастаний, формируются сосудистые интрамуральные каналы. В результате интенсивного капиллярообразования количество сосудов в грануляционной ткани в опыте достоверно увеличивается, а диаметр просвета сосудов уменьшается по сравнению с контролем. Полученные данные являются основанием для проведения дальнейших исследований с целью разработки клинических рекомендаций по использованию прогениторных клеток грануляционной ткани костномозговой полости в методах клеточной трансплантологии и тканевой инженерии, в частности для стимуляции ангиогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Экспериментальное изучение влияния импульсного инфракрасного лазерного излучения на регенерацию скелетной мышцы после механической травмы / Н. В. Булякова [и др.] // Вопр. курортологии, физиотерапии и леч. физкультуры. 2000. № 6. С. 8-11.
2. Ефанов О. И. Магнитолазерная терапия. М.: ООО «БИНОМ», 2002. 92 с.
3. Состояние клеток тимуса и костного мозга у крыс после воздействия импульсного инфракрасного лазерного излучения на травмированные скелетные мышцы / С. М. Зубкова [и др.] // Лазерная медицина. 2001. Т. 5, № 1. С. 28-30.
4. Ангиогенез / В. В. Куприянов [и др.]. М.: НИО «Квартет», 1993. 170 с.
5. Ламницкий Н. Я., Бинешевский Э. В. Механизмы стимулирования репаративного остеогенеза лазерным излучением // Стоματοлогия. 1993. № 5. С. 18-21.
6. Низкоинтенсивная лазерная терапия / под ред. С. В. Москвина, В. А. Буйлина. М.: Фирма «Техника», 2000. 724 с.
7. Primate adult brain cell autotransplantation, a new tool for brain repair? / J. F. Brunet [et al.] // Exp. Neurol. 2005. Vol. 196, No 1.

P. 195-198.

8. Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization : augmentation by stem cell factor / S. Fazel [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2005. Vol. 130, No 5. P. 1310.
9. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia / T. Iwase [et al.] // Cardiovasc. Res. 2005. Vol. 66, No 3. P. 543-551.
10. Mulekar S. V. Long-term follow-up study of 142 patients with vitiligo vulgaris treated by autologous, non-cultured melanocyte-keratinocyte cell transplantation // Int. J. Dermatol. 2005. Vol. 44, No 10. P. 841-845.
11. Neth U., Schupp K., Heymer A. Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel // Cytotherapy. 2005. Vol. 7, No 5. P. 447-455.
12. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease / B. E. Strauer [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. 2005. Vol. 46, No 9. P. 1651-1658.
13. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms / F. Togel [et al.] // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2005. Vol. 289, No 1. P. 31-42.

Рукопись поступила 27.08.09.

Сведения об авторах:

1. Ирьянов Юрий Михайлович – ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, заведующий лабораторией морфологии экспериментального отдела травматологии и ортопедии, д.б.н., профессор;
2. Ирьянова Татьяна Юрьевна - ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, научный сотрудник лаборатории морфологии экспериментального отдела травматологии и ортопедии, к.б.н.;
3. Дюрягина Ольга Владимировна – ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, заведующая клиникой животных, к.в.н.;
4. Ирьянова Вера Николаевна – ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, заведующая отделением физиотерапии.