

**Состояние опорных тканей при костной травме
в условиях стимуляции экстрактом фетальной костной ткани
(экспериментальное исследование)**

Н. А. Кононович, Н. В. Петровская, Е. Н. Горбач, Т. А. Ступина, С. Н. Лунева, М. А. Ковинька

***State of locomotor tissues for bone injuries under stimulation
with fetal bone tissue extract (experimental study)***

N. A. Kononovich, N. V. Petrovskaya, E. N. Gorbach, T. A. Stupina, S. N. Luneva, M. A. Kovinka

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. акад. Г. А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган (директор — д. м. н. А. В. Губин)

В эксперименте на взрослых беспородных собаках моделировали оскольчатые переломы костей голени (тип В2–В3), которые фиксировали при помощи чрескостной аппаратной конструкции. Изучали особенности репаративной регенерации костной ткани и состояние суставного хряща мышелков бедра в созданных условиях, а также при стимуляции остеогенеза экстрактом фетальной костной ткани. Определили, что использование экстракта фетальной костной ткани наряду со стимулирующим эффектом остеогенеза, характеризуемым сокращением сроков сращения поврежденных костей, снижает степень развития гистоструктурных нарушений в суставах, что указывает на возможность оптимизации адаптационно-регенераторных резервов поврежденных тканей опорной системы.

Ключевые слова: эксперимент; кость; суставной хрящ; оскольчатый перелом; экстракт; фетальная ткань; стимуляция; регенерация.

Comminuted leg bone fractures (B2–B3 type) were modeled in adult mongrel dogs and immobilized using a transosseous device. The details of bone tissue reparative regeneration and the condition of the femoral condyle articular cartilage were studied in the conditions produced, as well as in case of osteogenesis stimulation with fetal bone tissue extract. It was revealed that the use of fetal bone tissue extract alongside with the stimulating effect of osteogenesis, characterized by reducing the periods of involved bone consolidation, decreases the degree of histostructural articular disorders, thereby demonstrating the possibility of optimizing the adaptive-and-regenerative reserves of the locomotor system tissues involved.

Keywords: experiment; bone; articular cartilage; comminuted fracture; extract; fetal tissue; stimulation; regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время не возникает сомнений в значении биологического влияния биомеханических факторов на остеогенные потенции костной ткани при ее повреждении. Однако на разных стадиях сращения перелома возникают особые ситуации, требующие индивидуального подхода при выборе способа воздействия на процессы репаративной регенерации [6, 10, 11, 17].

В этом плане одним из новых перспективных самостоятельных медицинских направлений является фетальная терапия, основанная на трансплантации фетальных тканей, клеток и их экстрактов для активизации множественных резервных возможностей организма реципиента [1, 5, 7, 12]. В качестве источника фетального материала могут служить как нежизнеспособные плоды человека, так и плоды здоровых животных [2–4]. Действие полученной биомолекуляр-

ной массы основано на принципе органо-тканевого подобия (органный тропизм), механизм которого был доказан Г. Блобелем, нобелевским лауреатом 1999 года в области физиологии и медицины [13, 14]. Это и явилось мощным стимулом к разворачиванию исследований в данном направлении. Несмотря на имеющийся опыт клинического использования существующих органо-препаратов [8], ведется активная разработка технологий фетальных трансплантаций и рациональных схем их применения при различных патологических состояниях, в том числе — опорно-двигательной системы [9, 15, 16].

Цель исследования — оценить состояние опорных тканей при оскольчатых переломах костей голени в условиях стимуляции остеогенеза экстрактом фетальной костной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были проведены две серии опытов на 53 взрослых беспородных собаках обоего пола. Животным моделировали ударные крупно- и мелкооскольчатые переломы в средней трети диафизов берцовых костей (тип В2–В3). Конечность шинировали и через сутки после

травмы осуществляли чрескостный остеосинтез с закрытой репозицией перелома.

Во всех случаях фиксацию прекращали при появлении клинических и рентгенологических признаков костного сращения. В опытной серии через 14 суток

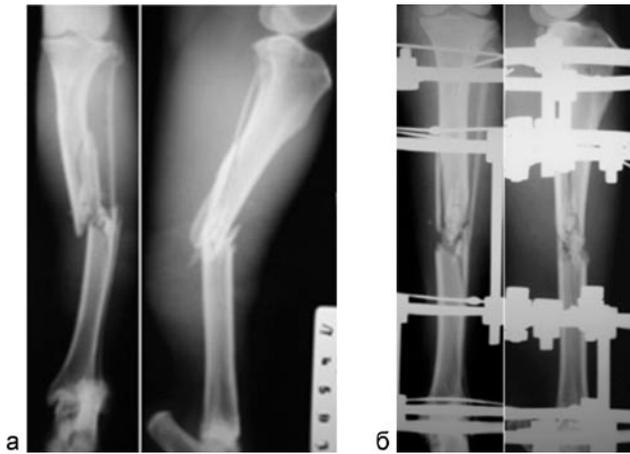


Рис. 1. Рентгенограммы голени в прямой и боковой проекции, собака №4587: а — после моделирования перелома, б — после остеосинтеза

аппаратной фиксации в область перелома однократно вводили ЭФКТ — экстракт фетальной костной ткани (приоритет № 2010100536000641 от 11.01.2010), приготовленный из костей свода черепа плодов собаки (оригинальная методика получения, С. Н. Лунева, М. А. Ковинька, 2005 год). Контрольную серию составили животные, которым стимулирующего воздействия не производили.

Животных выводили из опыта по завершении периода фиксации. Оперативные вмешательства и эвтаназию проводили в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации, предъявляемыми к работе

экспериментально-биологических клиник. На проведение исследований получено разрешение комитета по этике ФГБУ РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова.

Использовали рентгенологический, гистологический и статистический методы исследования. Рентгенографию проводили до и непосредственно после моделирования оскольчатого перелома, после выполнения чрескостного остеосинтеза, через 14 суток после остеосинтеза и по окончании периода фиксации. Гистологические исследования фрагментов диафизов в области перелома и суставного хряща мышечков бедра проводили по окончании периода фиксации. Использовали методы световой микроскопии и морфометрии площадей тканевых компонентов оцифрованных изображений области повреждения диафиза большеберцовой кости. Содержание остеотропных химических элементов в разных зонах новообразованного участка диафиза осуществляли при помощи метода рентгеновского электронно-зондового микроанализа.

Гистоморфометрические исследования суставного хряща заключались в определении его толщины (h, мкм), численной плотности хондроцитов (NAхц, мкм⁻²) и доли (%) пустых лакун (NAпуст лак) и изогенных групп (NAиз. гр) в общем объеме выборки. В качестве нормы исследовали суставной хрящ интактных животных (n = 5 суставов).

Анализ цифрового материала проводили методами описательной статистики. Достоверность различий оценивали в зависимости от характера распределения и объема выборок с помощью критериев Стьюдента и Вилкоксона для независимых выборок.

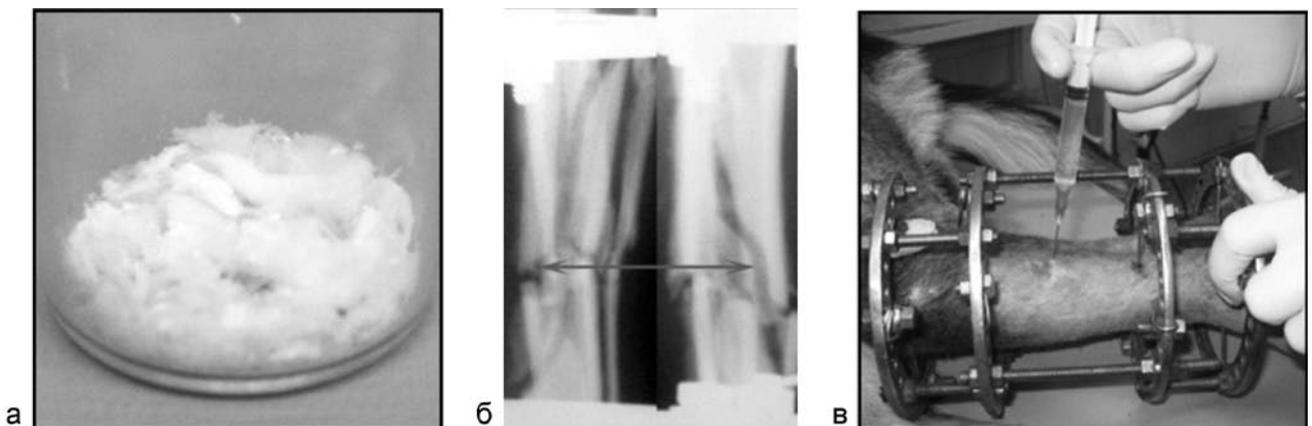


Рис. 2. Опытная серия: а — ЭФКТ, б — фрагменты рентгенограмм костей голени, фиксация 14 суток, стрелкой указана область трансплантации ЭФКТ, в — введение раствора ЭФКТ в области перелома берцовых костей собаки

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования показали, что рентгенологически у всех животных через 14 суток фиксации появлялись признаки репаративной регенерации. Как правило, терялась четкость контура кортикального слоя осколков и отломков. На их периферической поверхности (со стороны надкостницы) визуализировались «рыхлые» тени с размытыми волнообразными контурами, толщиной до

2,0 мм, не объединяющиеся между собой. Наличие последних характеризовало активность периостального остеогенеза. Пространство между осколками и отломками заполняли тени разной рентгенопрозрачности. Интенсивность теней, проецирующихся на костно-мозговую полость отломков, отражающих эндостальный остеогенез, плавно увеличивалась по направлению к зоне излома.



Рис. 3. Фрагменты рентгенограмм большеберцовых костей, контрольная серия опытов, фиксация 30 суток

Через 30 суток после остеосинтеза на рентгенограммах у животных контрольной серии концы отломков становились более четко выражены в сравнении с предыдущим сроком. В результате — межотломковая щель хорошо визуализировалась. Ее высота несколько увеличивалась, что свидетельствовало о превалировании процессов резорбции в области излома. Интенсивность теней, объединяющих отломки и осколки между собой, значительно увеличивалась. Периостальные наслоения начинали компактизироваться. Протяженность теней эндостального регенерата уменьшалась.

Рентгенологические признаки полного костного сращения определяли в среднем: в контрольной серии к $46,3 \pm 2,1$ суток фиксации, в опытной — к $32,4 \pm 2,7$ суток фиксации соответственно (уровень значимости различий сроков фиксации между сериями $p=0,05$). При этом на рентгенограммах межотломковую щель перекрывали высокоинтенсивные тени гомогенной структуры. Контуры концов отломков и осколков были размыты. Тени периостальных напластований объединялись между собой в зоне повреждения. Последние в контрольной серии были большего объема в сравнении с опытом.

Гистологически по окончании периода фиксации у животных контрольной серии между костными отломками наблюдалось костно-хрящевое сращение с участками рыхлой волокнистой соединительной ткани и гиалиноподобного и волокнистого хряща. В интермедиарной области регенерата преобладал гиалиноподобный хрящ с участками волокнистой соединительной ткани. Периостальная часть регенерата обеспечивала органное объединение отломков и была представлена участками среднелетливой губчатой кости с наличием небольших по площади островков волокнистой соединительной ткани. В эндостальной зоне наблюдались участки рыхлой волокнистой соединительной ткани, волокнистого и гиалинового хряща, а также крупнопетливой губчатой кости. В межтрабекулярных промежутках формировался студенистый и красный костный мозг. Отмечалась значительная порозность костных отломков.

В опытной серии к концу фиксации на гистотопограммах между отломками формировалось костное

сращение с небольшими участками гиалинового хряща. В интермедиарной области определялась среднепетлистая губчатая кость с признаками перестройки и компактизации. Периостальный компонент регенерата был представлен костно-хрящевой мозолью с признаками замещения хрящевой ткани грубоволокнистой костной. Эндостальная часть регенерата была представлена среднеячеистой трабекулярной сетью. В межтрабекулярных промежутках располагался ретикулофиброзный костный мозг с очагами кровотворения.

Данные морфометрии по соотношению тканевых компонентов регенерата к окончанию периода фиксации в зонах сращения у животных опытной серии подтвердили выраженность органотипической перестройки, о чем свидетельствовало процентное преобладание доли костной ткани и костного мозга при меньшем содержании волокнистого и хрящевого компонентов. Содержание Са в интермедиарной зоне превышало показатели контроля в среднем в 17 раз, в костномозговом канале — в 2 раза, в периостально образованной костной ткани — в 1,5 раза. Содержание Са в костных отломках также было достоверно выше контрольных показателей.

При исследовании суставного хряща мышечков бедра в контрольной серии опытов к концу периода фиксации были выявлены очаги его разволокнения, демаскировка коллагеновых волокон. В очагах разволокнения хондроциты находились в состоянии деструкции. В опытной серии к этому сроку разволокнение хряща не определяли. В поверхностной зоне хондроциты были функционально активны, их ядра гомогенны. Отмечали увеличение двухчленных изогенных групп.

В промежуточной и глубокой зоне во всех случаях были выявлены два типа изменений хондроцитов. Деструктивно измененные хондроциты, наиболее выраженные в контрольной серии, были аномальной формы, выявлены пустые лакуны и лакуны с клеточным детритом. Другие хондроциты характеризовались как функционально активные — увеличены их размеры, ядра светлые, гомогенные, в цитоплазме секреторные гранулы, липидные включения, интенсивная базофилия территориального матрикса. В опытной серии преобладали функционально активные хондроциты.

Количественный анализ выявил в контрольной серии достоверное ($p \leq 0,001$) снижение толщины хряща — $400,3 \pm 4,9$ мкм, в опытной — значения ($469,8 \pm 1,56$ мкм) были сопоставимы с интактной нормой — $475,5 \pm 1,3$ мкм. Сравнительный анализ долей пустых клеточных лакун в суставном хряще интактных собак (13,7%) и собак экспериментальных серий обнаружил существенную разницу в степени выраженности деструктивного процесса. В контрольной серии значения данного параметра составили 17,20%, в опытной — 14,45% в общем объеме выборки. Увеличение численной плотности изогенных групп в большей степени было выражено в опытной серии — 18,3% в общем объеме выборки (в контрольной — 13,7%; у интактных животных — 14,0%).

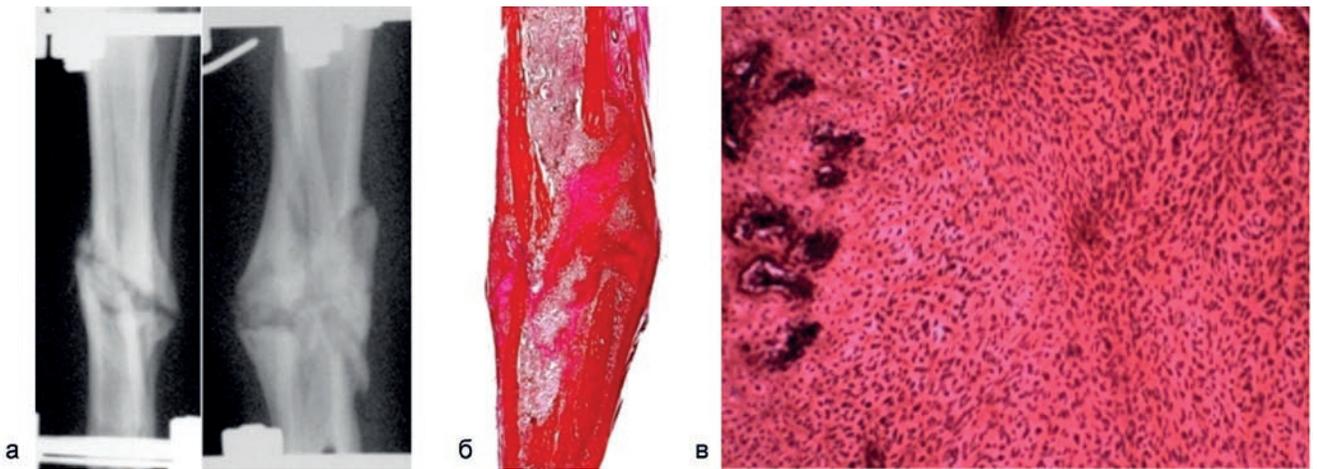


Рис. 4. Контрольная серия опытов, регенерат диафиза большеберцовой кости, конец фиксации: а — фрагменты рентгенограмм, б — гистотопограмма. Окраска по ван Гизону. Увеличение $\times 1,5$; в — участки волокнистого и гиалиноподобного хряща в интермедиарной области регенерата. Увеличение — 100

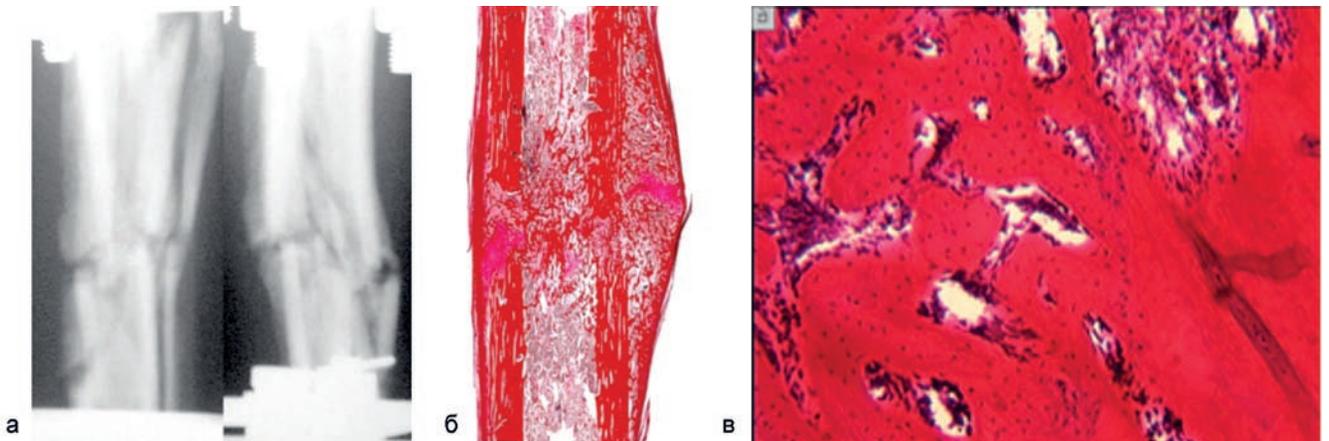


Рис. 5. Опытная серия, регенерат диафиза большеберцовой кости, конец фиксации: а — фрагменты рентгенограмм; б — гистотопограмма. Окраска по ван Гизону. Увеличение $\times 1,5$; в — мелкопетлистая губчатая кость, сформировавшаяся в интермедиарной области



Рис. 6. Диаграммы соотношения площадей тканевых компонентов регенерата к окончанию периода фиксации

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования определили, что у всех животных к окончанию периода фиксации между отломками формировалось костно-хрящевое сращение с участками волокнистой соединительной ткани. Тканевое соотношение в регенератах диафизов представлен-

ных экспериментальных серий имело достоверные отличия. В серии с использованием экстракта фетальной костной ткани сроки сращения сокращались на 28,0–30,0%, при этом костная ткань содержала большее количество кальция в сравнении с контролем.

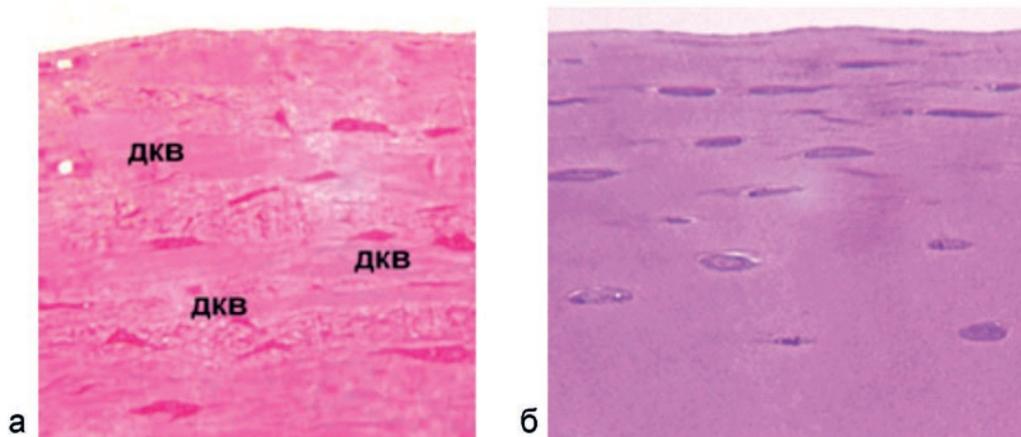


Рис. 7. Конец периода фиксации. Поверхностная зона суставного хряща. Полутопкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Ок. 12,5; об.40: а — контрольная серия, нарушена гомогенность межклеточного вещества, демаскировка коллагеновых волокон (ДКВ); б — опытная серия

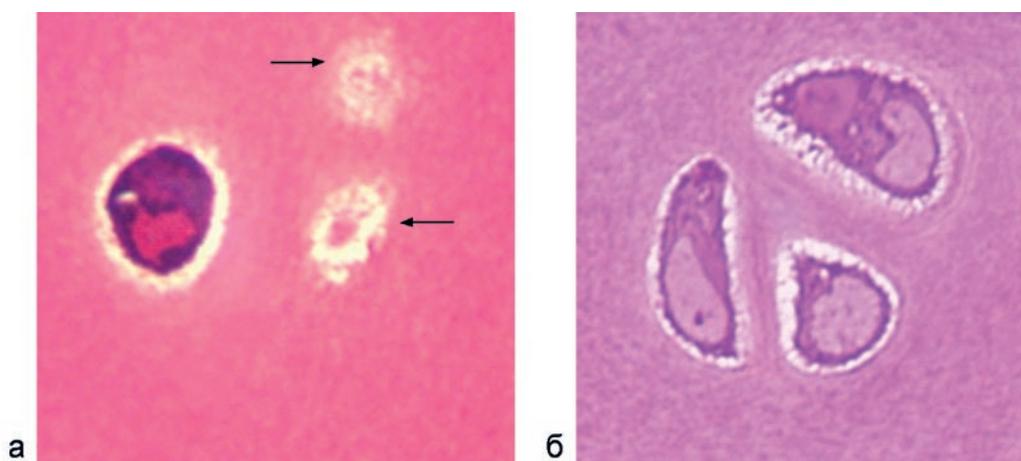


Рис. 8. Конец периода фиксации. Промежуточная зона хряща. Полутопкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Ок. 12,5; об. 100 МИ: а — контрольная серия, лакуны с клеточным детритом (стрелки); б — опытная серия, функционально активные хондроциты

В суставном хряще в данных условиях эксперимента наблюдались разнохарактерные процессы: деструктивные, репаративные и обратимые реактивные изменения. Интенсивнее деструктивные изменения проявлялись в контрольной серии в виде разволокне-

ния межклеточного вещества и гибели клеток, в опытной серии сохранялась гомогенность межклеточного вещества, гибель хондроцитов компенсировалась быстрой репопуляцией клеточного состава и активизацией синтеза компонентов межклеточного матрикса.

ВЫВОДЫ

1. В условиях чрескостного остеосинтеза период аппаратной фиксации при заживлении оскольчатых переломов длинных костей может заканчиваться при наличии костно-хрящевой мозоли между отломками с костной составляющей не менее 54,0%.
2. При переломах длинных костей, сопровождающихся значительным повреждением остеогенных тканей, в хряще смежных суставов происходят деструктивные, дегенеративные и обратимые реактивные изменения, сопровождающиеся разво-

- локнением межклеточного вещества и гибелью клеток.
3. Использование экстракта фетальной костной ткани, наряду со стимулирующим эффектом остеогенеза на фоне значительного сокращения сроков сращения поврежденных костей, заметно снижает степень развития гистоструктурных нарушений в суставах, что указывает на возможность оптимизации адаптационно-регенераторных резервов поврежденных тканей опорной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булатов А. А., Савельев В. И., Калинин А. В. Применение костных морфогенетических белков в эксперименте и клинике // Травматология и ортопедия России. 2005. №1 (34). С. 46–53.
2. Доскалийев Ж. А., Каюпов Б. А. Роль фетальных стволовых клеток в восстановлении нарушенных функций органов и тканей // Ежегодная Всероссийская и международная конференция «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении». 2007. URL: http://www.stem-cell.ru/news/cell_news.php?nom_news=930 (дата обращения 28.09.2009).
3. Использование первичной культуры фетальных хондробластов человека для ксенотрансплантации в дефект суставного хряща крыс / А. В. Сахаров [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2008. № 3. С. 136–140.

4. Ким И. И. Выделение и культивирование хондроцитов, полученных из различных источников // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006. № 4 (6). С. 48–50.
5. О перспективах использования наноматериалов в лечении повреждений и заболеваний тканей опорно-двигательной системы / В. И. Шевцов [и др.] // Гений ортопедии. 2008. № 4. С. 26–31.
6. Об оптимальных условиях репаративной регенерации опорных органов / Г. И. Лаврищева, Л. Н. Михайлова, Д. И. Черкес-Заде, Г. А. Оноприенко // Гений ортопедии. 2002. № 1. С. 120–125.
7. Онищенко Н. А., Цыпин А. Б. Пептидная биорегуляция восстановительных процессов в поврежденных органах // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. 2001. № 3–4. С. 87–93.
8. Органопрепараты. Фетальные органопрепараты — экстракты клеточного содержимого, как физиологические anti-aging-средства URL: <http://www.revitalize.ru/site.xp/049051048.html> (дата обращения 15.04.2009).
9. Рентгенологические особенности формирования distractionного регенерата в условиях использования кислоторастворимых эмбриональных костных белков (экспериментальное исследование) / А. В. Попков [и др.] // Клеточные и нанотехнологии в биологии и медицине: материалы Всерос. науч.-практ. конф. Курган, 2007. С. 86–87.
10. Сименач Б. И. Фрактурология — некоторые аспекты теоретизации учения о переломах костей. Ч. 2. Управление процессами репарации // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. № 4. С. 105–111.
11. Сименач Б. И. Фрактурология — некоторые аспекты теоретизации учения о переломах костей. Ч. 1. О генезисе синдрома перелома // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. № 4. С. 120–129.
12. Скалецкий Н. Н., Шумаков В. И. Лечение инсулинзависимого сахарного диабета методом трансплантации островковых клеток поджелудочной железы плодов и новорожденных // Трансплантация фетальных тканей и клеток. М., 1996. С. 33–40.
13. Matunis M. J., Wu J. A., Blobel G. SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex // J. Cell Biol. 1998. Vol. 140, No 3. P. 499–509.
14. Murphy J. B. The effect of adult chicken organ grafts on the chick embryo // J. Exp. Med. 1916. Vol. 24, No 1. P. 1–5.
15. Musil J., Novakova O., Kunz K. Biochemistry in schematic perspective. Prague: Avicenum, 1984. 215 p.
16. Organotherapy. Experience on rehabilitation of organs and tissues and their functions and some recommendations to doctors, medical students and scientific employees / ed. by Prof. I. D. Kirpatovsky. M., 2003. 49 p.
17. Wayne J. S., McDowell C. L., Willis M. C. Long-term survival of regenerated cartilage on a large joint surface // J. Rehabil. Res. Dev. 2001. Vol. 38, No 2. P. 191–200.

Рукопись поступила 10.09.10.

Сведения об авторах:

1. Кононович Наталья Андреевна — ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, с.н.с. лаборатории экспериментальной травматологии и ортопедии, к. б. н.
2. Петровская Наталья Вилловна — ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития России, в. н. с. лаборатории экспериментальной травматологии и ортопедии, к. м. н.
3. Горбач Елена Николаевна — ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, лаборатория морфологии, с. н. с., к. б. н.
4. Ступина Татьяна Анатольевна — ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, с.н.с. лаборатории морфологии, к. б. н.
5. Лунева Светлана Николаевна — ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, руководитель клинико-экспериментального лабораторного отдела, д. б. н., профессор.
6. Ковинька Михаил Александрович — ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, с. н. с. клинико-экспериментального лабораторного отдела, к. б. н.