

РЕПАРАТИВНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ОТКРЫТОГО ПЕРЕЛОМА ДИАФИЗА ДЛИННОЙ ТРУБЧАТОЙ КОСТИ У КРЫС ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕПАРАТА «ВИНФАР»

Миханов В.А.¹, Полякова В.С.¹, Копылов В.А.¹, Мхитарян Е.Е.¹, Мещеряков К.Н.¹, Бакаева Н.Р.¹, Шурьгина Е.И.¹

¹ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург, Россия (460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6), e-mail:vmikhanov@gmail.com

В ходе эксперимента выполнялись открытые переломы большеберцовой кости крыс с последующей инъекцией в область перелома препарата «Винфар» и исследованием микропрепаратов тканей зоны перелома. В результате были выявлены особенности внутри- и междифференной клеточной гетероморфии на различных сроках репаративного гистогенеза костной ткани при использовании препарата «Винфар». Было установлено, что благодаря своевременной и надежной фиксации отломков периостальной мозолью в опытной группе интермедиарная мозоль начинает формироваться на 7-е сутки, а образование костномозгового канала — с 14-х суток. Полагаем, что преобладание остеобластического типа дивергентной дифференцировки при воздействии препарата «Винфар» связано в том числе и со значительной активацией неоангиогенеза. Экспериментально доказано, что консолидация перелома диафиза большеберцовой кости при применении препарата «Винфар» происходит в более ранние сроки.

Ключевые слова: репаративный остеогенез, фактор роста фибробластов, «Винфар»

REPARATIVE HISTOGENESIS OF BONE TISSUE IN AN OPEN SHAFT FRACTURES OF LONG BONES IN RATS WITH PREPARATIONS "VINFAR"

Mikhanov V.A.¹, Polyakova V.S.¹, Kopylov V.A.¹, Mkhitaryan E.E.¹, Meshcheryakov K.N.¹, Bakaeva N.R.¹, Shurygina E.I.¹

¹Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia (460000, Orenburg, Sovetskaya str., 6), e-mail: vmikhanov@gmail.com

In the experiment performed open tibial fractures with subsequent injections in rats to fracture the drug «Vinfar» and research micropreparations tissue fracture zone. As a result, the peculiarities of the qualitative and quantitative composition of the cell for different periods of reparative histogenesis of bone tissue using the drug «Vinfar». It has been found that due to timely and reliable fixation of bone fragments periosteal callus in the experimental group of intermediate callus begins to form on day 7, and the formation of the medullary canal 14 days. We believe that the predominance of osteoblastic type divergent differentiation under the influence of the drug «Vinfar» connected, including with significant activation of neoangiogenesis. It is experimentally proved that the consolidation of the fracture of the tibial shaft when using the drug «Vinfar» occurs in earlier.

Keywords: reparative osteogenesis, fibroblast growth factor, «Vinfar»

Репарация костной ткани является одной из важнейших проблем регенеративной медицины, особенно травматологии, реконструктивной хирургии, стоматологии [3]. Ежегодно в мире травматизм, связанный с переломами костей, постоянно растет. При этом большой проблемой является высокая степень инвалидизации, закономерно увеличивающаяся с возрастом пострадавших [2]. В связи с этим перед современной медициной возникает задача стимуляции посттравматической регенерации костной ткани, особенно при ограничении собственных компенсаторных реакций организма, обусловленном различными этиологическими факторами. Решение данной задачи может осуществляться в двух направлениях. Во-первых, путем активации защитно-приспособительных резервов

организма в целом, что достигается использованием витаминов, анаболических гормонов и ряда других препаратов. Однако при этом может возникнуть проблема недостаточной величины самих компенсаторных резервов, превысить которую в этом случае невозможно [1]. Другой путь – местная активация репаративной регенерации путем использования стимуляторов регенерации – репарантов, к которым относятся факторы роста, в частности фактор роста фибробластов (ФРФ) [5].

В 2011 г. на кафедре травматологии и ортопедии Оренбургской государственной медицинской академии разработан препарат «Винфар», содержащий ФРФ (Патент № 2427644 от 27.08.2011), выделенный из метаболитов штамма бактерий *Bacillus subtilis* 804.

Цель исследования – изучение особенностей репаративного гистогенеза костной ткани в условиях открытого диафизарного перелома длинной трубчатой кости крыс при использовании препарата «Винфар».

Материал и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на 70 половозрелых крысах самцах линии «Вистар». Все исследования на животных были выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза СССР от 13.11.1984 г. № 724). Животным под ингаляционным наркозом формировали открытый поперечный перелом средней трети диафиза левой большеберцовой кости. В опытной группе (ОГ) животным в область перелома на 1-е и 2-е сутки эксперимента вводили по 0,5 мл препарата «Винфар», в контрольной группе (КГ) – 0,5 мл физраствора. Осуществлена естественная иммобилизация посредством сохранившей целостность малоберцовой кости. Животных выводили из опыта на 3-и, 7-е, 14-е, 21-е, 44-е и 61-е сутки. Фрагменты отломков костей с костной мозолью фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине (на фосфатном буфере) с последующей декальцинацией смесью: Трилон Б + 40% NaOH + H₂O(дист.), обезвоживанием в спиртах возрастающей крепости, заливкой кусочков парафином — целлоидином и изготовлением гистосрезов толщиной 5,0 мкм. Исследования проводили с использованием гистологических, иммуногистохимических методов и морфометрии. Гистологическое исследование включало окраску гематоксилином Майера и эозином. При проведении иммуногистохимических методов исследования для выявления экспрессии CD34 (маркер эндотелиоцитов), CD68 (маркер макрофагов, хондро- и остеокластов) и collagen I использовались соответственно антитела anti-CD34 и anti-CD68 («SPRING Bioscience», США), anti-Collagene I Type («GeneTex», США). Используемая система детекции — Reveal Polyvalent HRP – DAB Detection System («SPRING Bioscience», США). Подсчет клеток производился в абсолютных значениях (абсолютная численная плотность — АЧП) при общем увеличении x300 на площади соответствующего среза (поля зрения – п.з.), равной 0,077 мм² минимум в 5 полях

зрения для каждого показателя. Подсчет площади коллагеновых волокон производился в относительных значениях (относительная объёмная плотность - ООП), как отношение площади коллагена I типа к общей площади тканевых элементов в пределах исследуемого гистосреза на 1 микрофотографии (равной 1 полю зрения) при увеличении $\times 300$ минимум в 5 полях зрения (микрофотографий) для каждого показателя. При проведении статистической обработки результатов вычисляли средние значения абсолютных и относительных величин (M), ошибки средних величин (m) и t -критерий Стьюдента. Различия считали достоверно значимыми при уровне вероятности $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. На 3-и сутки у животных контрольной группы (КГ) в интермедиарной зоне перелома выражена воспалительная реакция: отек, лейкоцитарная инфильтрация, появление грануляционной ткани, отсутствие остеокластов. Пролиферирующие клетки надкостницы начинают дифференцироваться в хондробласты (АЧП $101,0 \pm 8,0$ /п.з.), формируя тонкий слой периостальной костной мозоли толщиной $0,26 \pm 0,015$ мм. Признаки формирования эндостальной костной мозоли отсутствуют.

На 3-и сутки у животных опытной группы (ОГ) в области интермедиарной мозоли воспалительная реакция нивелирована, имеется обилие волокнистого матрикса, появившиеся остеокласты формируют лакуны резорбции в интермедиарной зоне костных отломков. На фоне развитой грануляционной ткани заметна выраженная пролиферация клеток мезенхимы с началом дифференцировки фибробластоподобных клеток предшественников в хондробласты и остеобласты. Сформирована толстая периостальная костная мозоль (толщина $0,79 \pm 0,020$ мм), хрящ которой в центральных отделах состоит преимущественно из хондроцитов (АЧП $31,0 \pm 4$ /п.з.), часть которых в состоянии вакуолярной дистрофии и лизиса (деградация хряща). В периферических отделах формирующейся периостальной мозоли число остеобластов достигает $66,0 \pm 5,0$ /п.з., а остеоцитов – $10,0 \pm 2,0$ /п.з., т.е. преобладают процессы остеогенной дифференцировки фибробластоподобных клеток-предшественников. В эндостальной зоне перелома признаки пролиферации клеток эндоста с миграцией в интермедиарную зону, на границе с которой формируется тонкая прослойка хряща. Заметна реакция остеокластов (АЧП $3,0 \pm 1,0$ /п.з.). Эндостальная костная мозоль в центральных отделах представлена значительным числом пролиферирующих фибробластоподобных клеток-предшественников (АЧП $411,0 \pm 25,0$ /п.з.) с отсутствием признаков хондро- и/или остеогенной дифференцировки. Число эндотелиоцитов (АЧП $25,0 \pm 3,0$ /п.з.) двукратно превосходит этот же показатель в группе контроля (АЧП $13,0 \pm 2,0$ /п.з.). Важными отличиями гистоархитектоники места перелома в ОГ на 3-и сутки являются более выраженная реакция фибробластов в зоне перелома, появление в периферических частях хрящевой манжетки

участков остеонной ткани. Характерно, что в ОГ в костных отломках остеонны сохранены в большей степени, чем в КГ, где большинство костных лакун запустевшие.

На 7-е сутки в контроле в интермедиарной зоне перелома на фоне развитой грануляционной ткани заметна пролиферация клеток мезенхимы (АЧП $195,0 \pm 13,0$ /п.з.), в небольшом количестве появляется волокнистый матрикс (ООП коллагена I типа $4,83 \pm 1,02\%$) и небольшие группы остеонных клеток (АЧП остеонных и остеонных $33,0 \pm 5,0$ /п.з.). Остеонны единичны (АЧП 1-2/п.з.), резорбция костных отломков не выражена. Толстый хрящ периостальной костной мозоли (толщина $1,25 \pm 0,14$ мм) состоит из хондронных и хондронных (АЧП хондронных и хондронных $165,0 \pm 15,0$ /п.з.), незначительная часть которых в состоянии вакуолярной дистрофии и лизиса. В эндостальной зоне перелома признаки пролиферации клеток эндоста с дифференцировкой преимущественно в остеонны (АЧП остеонных $33,0 \pm 4,0$ /п.з.) и формированием незрелой ретикулофиброзной костной ткани, частично заполняющей костномозговой канал в области костных отломков.

На 7-е сутки в опыте со стороны периостальных зон перелома начинает формироваться интермедиарная мозоль, состоящая из хряща, клеточный состав которого представлен небольшим числом хондронных (АЧП $25,0 \pm 3,0$ /п.з.). Центральные же отделы интермедиарной зоны содержат редуцирующуюся грануляционную ткань с обилием волокнистого матрикса и пролиферирующих остеонных клеток (АЧП остеонных $173,0 \pm 17,0$ /п.з.). Периостальная костная мозоль деградирует за счет лизиса хондронных и формирования хондронными очагов резорбции с замещением хряща на хорошо васкуляризованную волокнистую соединительную ткань (АЧП эндотелионных $25,0 \pm 3,0$ /п.з.) с формированием остеонных островков ретикулофиброзной кости. Эндостальная костная мозоль представлена деградирующим хрящем с формированием костных балок, состоящих из остеонных и незрелого внеклеточного остеонного матрикса. Остеонны (АЧП $5,0 \pm 2,0$ /п.з.) формируют многочисленные лакуны резорбции.

На 14-е сутки в контроле в интермедиарной зоне перелома на фоне остатков редуцирующейся грануляционной ткани увеличивается ООП волокнистого матрикса (ООП коллагена I типа $9,24 \pm 2,14\%$) с группами пролиферирующих остеонных клеток (АЧП остеонных $93,0 \pm 8,0$ /п.з.). Остеонны (АЧП $3,0 \pm 1,0$ /п.з.) активно участвуют в резорбции костных отломков. Периостальная костная мозоль деградирует за счет лизиса хондронных (АЧП $44,0 \pm 5,0$ /п.з.) и формирования хондронными очагов резорбции с замещением хряща на волокнистую соединительную ткань. Небольшие тяжи хряща периостальной костной мозоли проникают в интермедиарную зону, таким способом образуя хрящевой компонент интермедиарной костной мозоли. На данном сроке в КГ отмечаем и наибольшую активность

хондрокластов (в ОГ она наблюдалась уже на 7-е сутки), обеспечивающих резорбцию хрящевой ткани периостальной мозоли. Эндостальная костная мозоль представлена деградирующим хрящом и формирующимися костными балками, состоящими преимущественно из остеобластов (АЧП $79,0 \pm 6,0$ /п.з.) и незрелого внеклеточного остеοидного матрикса (ООП коллагена I типа $3,33 \pm 1,01\%$). Эндостальная костная мозоль глубоко заполняет весь просвет костномозгового канала и переходит в интермедиарную мозоль.

На 14-е сутки в опытной группе интермедиарная костная мозоль представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования ретикулофиброзной кости, состоящими преимущественно из остеобластов (АЧП $108,0 \pm 9,0$ /п.з.), а также значительного числа остеοцитов (АЧП $91,0 \pm 6,0$ /п.з.) и незрелого внеклеточного остеοидного матрикса (ООП коллагена I типа $15,61 \pm 2,89\%$). Периостальная костная мозоль, так же как и периферические отделы интермедиарной, состоит из остатков деградирующего хряща и очагов формирующейся незрелой ретикулофиброзной кости, достигая на этом сроке максимальной толщины $1,82 \pm 0,54$ мм. Эндостальная костная мозоль представлена сформированными костными балками, состоящими из остеобластов (АЧП $95,0 \pm 7,0$ /п.з.) и уже значительного числа остеοцитов (АЧП $55,0 \pm 4,0$ /п.з.). ООП коллагена I типа внеклеточного остеοидного матрикса составляет $6,97 \pm 1,52\%$. При этом новообразованные балки эндостальной мозоли активно разрушаются многочисленными остеокластами (АЧП $7,0 \pm 2,0$ /п.з.) за счет формирования лакун резорбции, т.е. уже на этом сроке инициируется процесс формирования костномозгового канала с появлением пока еще единичных гемопоэтических островков клеток красного костного мозга (АЧП $25,0 \pm 7,0$ /п.з.).

На 21-е сутки в группе контроля интермедиарная костная мозоль по-прежнему представлена очагами редуцирующейся грануляционной ткани и широкими участками волокнистого матрикса (ООП коллагена I типа $11,25 \pm 2,12\%$) с группами пролиферирующих клеток преимущественно фибробластического дифферона (АЧП $27,0 \pm 4,0$ /п.з.). Периостальная костная мозоль, так же как и периферические отделы интермедиарной, представлена остатками деградирующего хряща (АЧП хондробластов и хондроцитов $65,0 \pm 7,0$ /п.з.) и очагами формирования незрелой ретикулофиброзной кости (АЧП остеобластов и остеοцитов $140,0 \pm 11,0$ /п.з.). При этом хрящ дистальных отделов периостальной мозоли практически полностью замещен трабекулами ретикулофиброзной кости. Толщина периостальной мозоли продолжает увеличиваться, достигая на этом сроке $2,48 \pm 0,61$ мм, что объясняется отсутствием стабильной мобилизирующей функции костной мозоли. Широкую эндостальную костную мозоль формируют костные балки, состоящие преимущественно из остеобластов (АЧП $83,0 \pm 7,0$ /п.з.) и небольшого числа остеοцитов (АЧП

9,0±2,0/п.з.), замурованных в остеοидный матрикс (ООП коллагена I типа 8,47±1,63%). На этом инициируется процесс формирования костномозгового канала с появлением немногочисленных гемопоэтических островков клеток красного костного мозга (АЧП 47,0±9,0/п.з.).

На 21-е сутки у животных ОГ вся площадь (периферические и центральные отделы) интермедиарной костной мозоли представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования ретикулофиброзной кости, состоящими преимущественно из остеобластов (АЧП 155,0±12,0/п.з.) и незрелого внеклеточного остеοидного матрикса (ООП коллагена I типа 20,7±3,71%). Периостальная костная мозоль представлена широкими полями ретикулофиброзной кости и лишь небольшими очагами деградирующего хряща (АЧП хондроцитов 4,0±1,0/п.з.). Толщина периостальной мозоли (1,802±0,25 мм) сохраняет значения, сопоставимые с предыдущим сроком, что означает стабильную мобилизирующую функцию костной мозоли при данной толщине уже на этом сроке. Эндостальная костная мозоль представлена узкой полоской сформированной костными балками грубоволокнистой кости (ООП коллагена I типа 19,24±3,25%) на границе с интермедиарной зоной. При этом новообразованные балки эндостальной мозоли активно разрушаются остеокластами (АЧП 5,0±2,0/п.з.), за счет формирования лакун резорбции, т.е. прогрессирует процесс формирования костномозгового канала с появлением уже многочисленных гемопоэтических островков клеток красного костного мозга (АЧП 147,0±18,0/п.з.).

На 44-е сутки у крыс КГ интермедиарная костная мозоль все еще включает небольшие очаги деградирующего хряща (АЧП хондробластов и хондроцитов 40,0±5,0/п.з.) на фоне формирующихся балок ретикулофиброзной кости, состоящих из остеобластов (АЧП 85,0±8,0/п.з.) и остеοцитов (АЧП 105,0±11,0/п.з.), замурованных в остеοидный матрикс (ООП коллагена I типа 21,23±4,13%). Периостальная костная мозоль истончена (толщина 0,27±0,08 мм) и представлена узкими полями немногочисленных балок грубоволокнистой кости, активно подвергающихся резорбции остеокластами (АЧП 4,0±1,0/п.з.) и лишь небольшим участком деградирующего хряща в центре консолидированного перелома. Эндостальная костная мозоль представлена подвергающимися резорбции все еще многочисленными широкими костными балками ретикулофиброзной кости, глубоко пронизывающими костномозговой канал в дистальном направлении.

На 44-е сутки в опытной группе намечается ремоделирование интермедиарной костной мозоли в диафиз трубчатой кости: из хаотично расположенных на более ранних сроках балок грубоволокнистой кости начинает формироваться компактное и губчатое вещество. Периостальная костная мозоль (толщина 0,102±0,05 мм), сохранившись небольшим участком на границе с интермедиарной костной мозолью, на остальном

протяжении уже преобразована в надкостницу (рис. 1) и состоит из хорошо различимых внутреннего (остеогенного) и наружного (фиброзного) (АЧП фибробластов $78,0 \pm 6,0/\text{п.з.}$) слоев. Эндостальная костная мозоль значительной частью редуцирована и представлена немногочисленными узкими костными балками ретикулофиброзной кости лишь на границе с интермедиарной зоной преимущественно у эндоста и формирующимся костномозговым каналом, представленным значительным числом клеток красного костного мозга (АЧП $210,0 \pm 16,0/\text{п.з.}$) в составе гемопоэтических островков (рис. 2).

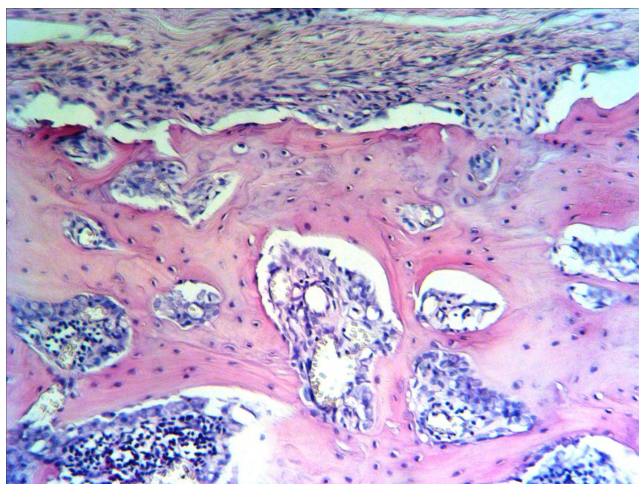


Рис. 1. Опытная группа. Область перелома большеберцовой кости (интермедиарная костная мозоль), 44-е сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Об. ув. $\times 150$

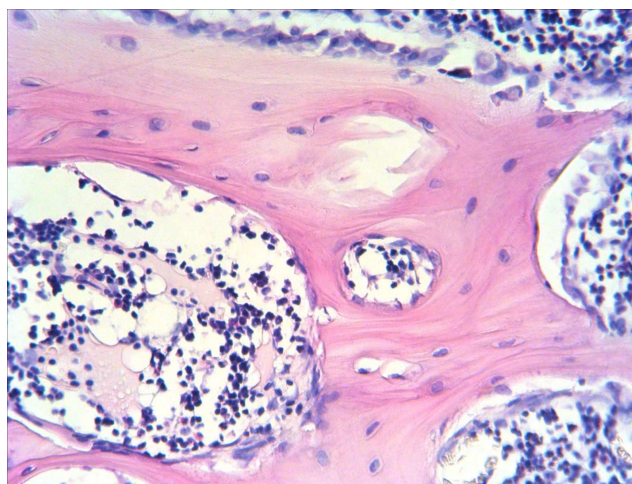


Рис. 2. Опытная группа. Область перелома большеберцовой кости (эндостальная костная мозоль), 44-е сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Об. ув. $\times 300$

На 61-е сутки в группе контроля интермедиарная костная мозоль представлена разросшейся ретикулофиброзной костной тканью, местами с еще сохраненными мелкими очагами деградирующего гиалинового хряща (АЧП хондроцитов $14,0 \pm 3,0/\text{п.з.}$) и немногочисленными костномозговыми полостями без признаков формирования костномозгового канала. Эндостальная костная мозоль представлена немногочисленными, но широкими костными балками грубоволокнистой кости преимущественно на границе с интермедиарной зоной и у эндоста. На месте редуцирующейся эндостальной мозоли формируется костномозговой канал с АЧП $251,0 \pm 19,0/\text{п.з.}$ клеток красного костного мозга.

На 61-е сутки у животных опытной группы наблюдается полная консолидация перелома с полноценной перестройкой костной мозоли в диафиз трубчатой кости с органотипичным строением периоста, эндоста, а также преимущественно пластинчатого строения кости с разделением на компактное и губчатое вещество. Губчатое вещество восстановленного костномозгового канала на месте бывшей эндостальной костной мозоли отличается от губчатого вещества диафиза кости вне зоны перелома лишь большим числом и большей толщиной костных балок (АЧП остеобластов и остеоцитов $42,0 \pm 5,0/\text{п.з.}$).

Заключение. Применение препарата «Винфар» лимитирует выраженность воспалительного процесса (вероятно, в связи с наличием антимикробных веществ в составе

метаболитов *Bacillus subtilis* 804), сокращая фазу ранних посттравматических изменений. В обеих сравниваемых группах сращение отломков кости проходит хрящевую стадию, но в ОГ наряду с формированием более массивной хрящевой манжетки уже к 3-м суткам наблюдаем и раннюю резорбцию хряща (14-е сутки). Благодаря своевременной и надежной фиксации отломков периостальной мозолью в ОГ интермедиарная мозоль начинает формироваться на 7-е сутки (в КГ – на 14-е сутки), а образование костномозгового канала в ОГ отмечаем с 14-х суток (в КГ – с 21-х суток). В ОГ уже на 3-и сутки наблюдается значительная активация неоангиогенеза (АЧП эндотелиоцитов $42,0 \pm 6,0$ /п.з., а КГ – $7 \pm 2,0$ /п.з.), что обеспечивает не только более ранние сроки образования костной мозоли, но и преобладание остеобластического типа дивергентной дифференцировки в междифферонной гетероморфии за счет создания лучших условий оксигенации по сравнению с контролем [4].

Таким образом, консолидация перелома диафиза большеберцовой кости при применении препарата «Винфар» происходит в более ранние сроки, что, вероятно, обусловлено мощным ангиогенным воздействием входящего в его состав ФРФ, а также влиянием на пролиферативную активность хондрогенных и остеогенных элементов.

Список литературы

1. Алексеев А.А., Бобровников А.Э. Местное применение стимуляторов регенерации для лечения ран // Комбустиология. – 2010. – вып.41. – С. 5–15.
2. Марков Д.А. Стимуляция репаративного гистогенеза при лечении диафизарных переломах длинных костей // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Саратов, 2008. – 23 с.
3. Омеляненко Н.П. Современные возможности оптимизации репаративной регенерации костной ткани / Н.П. Омеляненко, С.П. Миронов, Ю.И. Денисов-Никольский и др. // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2002. – № 4. – С. 85–88.
4. Kanczler J.M., Oreffo R.O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone // Eur. Cell Mater. – 2008. – Vol. 15. – P. 100–114.
5. Ornitz D.M. Fibroblast growth factors // Genon Biology. – 2001. – № 2. – P. 3005.1-3005.12.

Рецензенты:

Шевлюк Н. Н., д.б.н., профессор, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Оренбургского государственного медицинского университета, г. Оренбург;
Сафронов А.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии Оренбургского государственного медицинского университета, г. Оренбург.