

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ β -АЛАНИЛАМИДА БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ СТАФИЛОКОККОВОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ У КРЫС ВИСТАР

Жураковский И.П.¹, Толстикова Т.Г.², Сорокина И.В.², Жукова Н.А.²,
Борисова М.С.², Маринкин И.О.¹, Аутеншлюс А.И.¹

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Новосибирск, e-mail: murash2003@yandex.ru;

²ФГБУН «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова» СО РАН, Новосибирск

Проведено иммуногистохимическое и морфологическое исследование костной ткани большеберцовой кости крыс-самцов после инокуляции *Staphylococcus aureus* (штамм 209) и введения β -аланиламида бетулоновой кислоты (бетамид) в дозе 50 мг/кг в виде водно-масляной эмульсии. В ходе эксперимента у всех 42 животных наблюдали развитие остеомиелита. Показано, что введение бетамида предотвращает генерализацию и хронизацию воспалительного процесса (формирование обширных зон некроза и инфильтрации, остеокластическую резорбцию кости, формирование секвестров) и способствует его разрешению. Установлено, что под влиянием бетамида наблюдается более раннее и выраженное образование рыхлой волокнистой соединительной и грубоволокнистой костной тканей. Бетамид вызывает ускоренное наступление фазы функциональной адаптации, способствуя быстрому завершению репаративного эндохондрального остеогистогенеза с образованием зрелой костной ткани.

Ключевые слова: костная ткань, остеомиелит, *Staphylococcus aureus*, β -аланиламид бетулоновой кислоты, бетамид.

THE EFFICIENCY OF β -ALANYLAMIDE OF BETULONIC ACID IN WISTAR RATS UNDER STAPHYLOCOCCUS OSTEOMYELITIS

Zhurakovsky I.P.¹, Tolstikova T.G.², Sorokina I.V.², Zhukova N.A.²,
Borisova M.S.², Marinkin I.O.¹, Autenshlyus A.I.¹

¹Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, e-mail: murash2003@yandex.ru

²N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Immunohistochemical and morphological investigation of the male rats' shinbone tissue was carried out after inoculation of *Staphylococcus aureus* (strain 209) and subsequent administration of β -alaninamide of betulonic acid (betamide) in a dose of 50 mg/kg in the form of oil-water sludge. During the experiment the osteomyelitis progression was observed in all animals. It has been shown that betamide administration prevents the generalization and chronization of the inflammatory process (formation of wide zones of necrosis and infiltration, osteoclastic resorption, sequester formation) and promotes its resolution. It has been established that under the influence of betamide the formation of loose areolar connective tissue and coarse-fibered bone tissue occurs earlier. Betamide accelerates the functional adaptation, contributing in fast termination of reparative endochondral osteohistogenesis resulting in the formation of mature bone tissue.

Keywords: bone tissue, osteomyelitis, *Staphylococcus aureus*, β -alanylamine of betulonic acid, betamide.

Остеомиелит - гнойно-некротический процесс, развивающийся в кости и костном мозге, а также в окружающих их мягких тканях. Для лечения этого заболевания широко применяются антибиотики [5; 6; 10]. Однако помимо того, что они часто оказывают побочные действия, сама реакция микроорганизмов к антибиотикам подвержена существенным изменениям, характеризующимся увеличением их устойчивости к применяемым препаратам. Все это стимулирует научные исследования, направленные на поиск новых средств лечения остеомиелита. В частности, была выявлена активность

бетулоновой кислоты и её амида, в том числе против *Staphylococcus aureus* [2], который является наиболее распространенным этиологическим фактором остеомиелита [3; 7; 8].

Целью настоящего исследования являлось изучение эффективности применения β-аланиламида бетулоновой кислоты (N-[3-оксо-20(29)лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислота; предполагаемое коммерческое название - «бетамид») для лечения остеомиелита стафилококковой этиологии у экспериментальных животных.

Материал и методы исследования

Эксперимент проведен на 48 половозрелых крысах-самцах Wistar с исходной массой 180–220 г, по 6 особей в группах у которых с помощью инокуляции суточной культуры *Staphylococcus aureus* (штамм 209) был воспроизведен остеомиелит [1]. Животных выводили из эксперимента через 1, 2 и 3 месяца. В ходе эксперимента были сформированы группы с воспалением: «В 1 мес.»; «В 2 мес.»; «В 3 мес.». В качестве контроля использовали 6 интактных животных (группа «Инт»). Группе животных «ВО 2 мес.» вводили водно-масляную эмульсию в течение 10 дней до истечения 2-месячного срока с момента инокуляции *Staphylococcus aureus*, а в группе животных «ВО 3 мес.» введение водно-масляной эмульсии продолжали до окончания 3 месяцев. В группе животных «ВОБ 2 мес.» вводили бетамид в дозе 50 мг/кг в виде водно-масляной эмульсии в течение 10 дней до окончания 2 месяцев с момента инокуляции *Staphylococcus aureus*. В группе животных «ВОБ 3 мес.» введение водно-масляной эмульсии с бетамидом продолжали до окончания 3-месячного срока с момента инфицирования.

Большеберцовую кость фиксировали в 12%-ном формалине с последующей декальцинацией в растворе «Biodeck R» (Bio-Optica Milano SPA, Италия). Из залитых в парафин объектов делали серийные срезы толщиной 7 мкм. Морфологию большеберцовой кости оценивали при обзорной микроскопии после окраски срезов гематоксилином Эрлиха и эозином. Коллагеновые волокна выявляли пикрофуксином по Ван Гизону, сульфатированные гликозаминогликаны – альциановым синим при pH 1,0 с последующей докраской ядер кармалюмом Майера. Для иммуногистохимического анализа использовали стандартный метод фиксации тканей в нейтральном формалине с последующей дегидратацией и заливкой в парафин. Иммуногистохимическое исследование по оценке уровня экспрессии маркера клеток макрофагального ряда (Anti-Mononuclear Phagocyte-Biotin (Clone: 1C7, Isotype: Mouse IgG1; BD Biosciences) проводили с помощью непрямого стрептавидин-биотинового пероксидазного метода. В работе использовали систему визуализации Peroxidase Detection System (Novocastra). После процедуры демаскировки иммуногистохимическую окраску препаратов проводили в соответствии с общепринятыми

стандартами указанной методики [4; 9] и в соответствии с рекомендациями фирм-производителей.

Анализ интенсивности окрашивания коллагеновых волокон проводили с помощью светооптического микроскопа и морфометрического комплекса на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13c (Baumer Electric GmbH, Германия) и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США). Для каждой группы оценивалось 48 изображений.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета для статистической обработки SPSS v 13.0 for Windows. Для сравнения независимых групп использовали критерий Краскела–Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна–Уитни. Различия между значениями сравниваемых параметров расценивали как статистически значимые при $p < 0,05$. Полученные в ходе исследования данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах (Q_1 ; Q_3).

Результаты исследования и обсуждение

При морфологическом исследовании большеберцовой кости через 1 месяц после трепанации и введения нити с культурой *Staphylococcus aureus* наблюдались признаки остеомиелита. Так, в месте костного дефекта выявлялись обширные зоны некроза и инфильтрации грануло-, лимфо- и гистиоцитарными элементами, располагающимися в непосредственной близости к введенным в трепанационное отверстие нитям с золотистым стафилококком. При этом отмечалось достаточно четкое зонирование клеточных элементов. Как правило, в фокусе таких инфильтратов находились скопления нейтрофилов, которые были окружены лимфоцитарно-макрофагальным валом. Обращало на себя внимание отсутствие на данном сроке признаков ангиогенеза, присущих неинфицированному перелому, и может расцениваться как недостаточность репаративных процессов при остеомиелите. Со стороны сохраненных балок наблюдалась остеокластическая резорбция костной ткани, а также продуктивно-воспалительная реакция эндоста и периоста.

Через 2 месяца после инокуляции *Staphylococcus aureus* сохранялись зоны некроза костного мозга в непосредственной близости от введенных хлопчатобумажных нитей, ограниченные валом лимфоцитарных и макрофагальных элементов, переходящим в макрофагально-фибробластический барьер (рис. 1). Наблюдалась остеокластическая резорбция и фрагментация балок губчатой костной ткани. Достаточно часто в зоне некроза встречались костные осколки с остеócитами, подвергшимися деструкции, что может служить неблагоприятным фактором, приводящим к хронизации процесса.

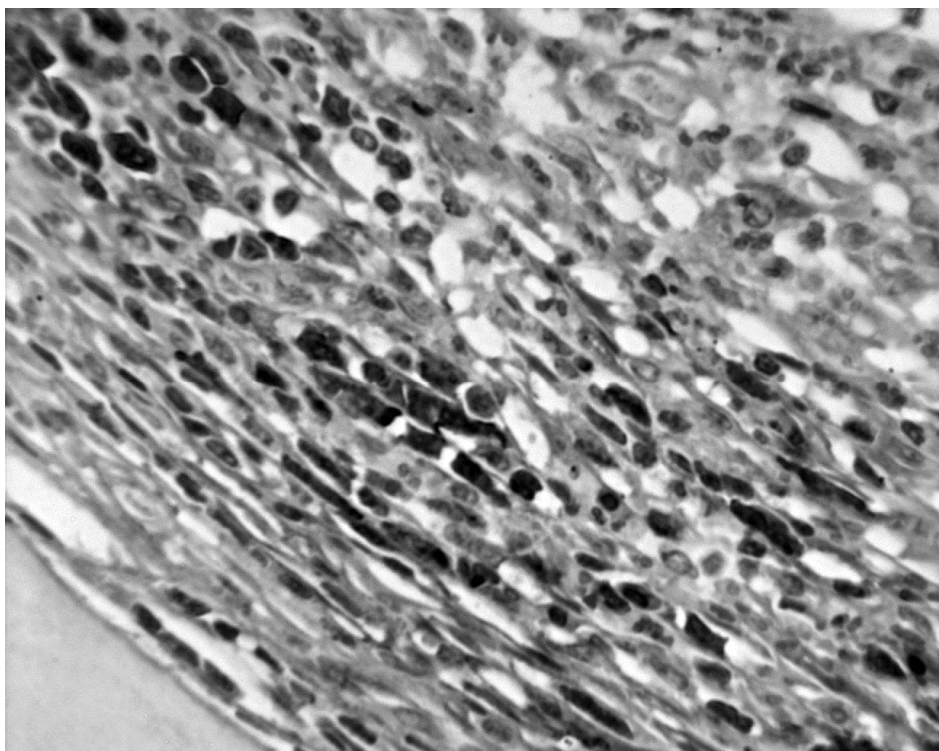


Рис. 1. Участок большеберцовой кости крысы через 2 мес. после инокуляции Золотистого стафилококка. Формирование макрофагально-фибробластического барьера, ограничивающего зону некроза. Иммуногистохимическая реакция на ED1-подобный антиген с последующей докраской ядер гематоксилином. Ув. 600

При морфологическом изучении большеберцовой кости через 3 месяца после инокуляции *Staphylococcus aureus* отмечалось сохранение зон некроза костного мозга, ограниченных макрофагально-фибробластическим барьером. В зонах расположения введенных хлопчатобумажных нитей наблюдалось большое количество макрофагов и гигантских многоядерных клеток Пирогова-Лангханса, содержащих многочисленные ядра по периферии цитоплазмы в виде кольца. Костные балки были фрагментированы, содержали немногочисленные, неравномерно расположенные остециты, участки с очаговым просветлением. Отмечалось заполнение пространств между костными балками фиброзной тканью с большим содержанием коллагеновых волокон. Так же как и в предыдущей группе, достаточно часто в зоне некроза встречались костные осколки с остеocyтами, подвергшимися деструкции (рис. 2), что определяло хроническое течение остеомиелита.

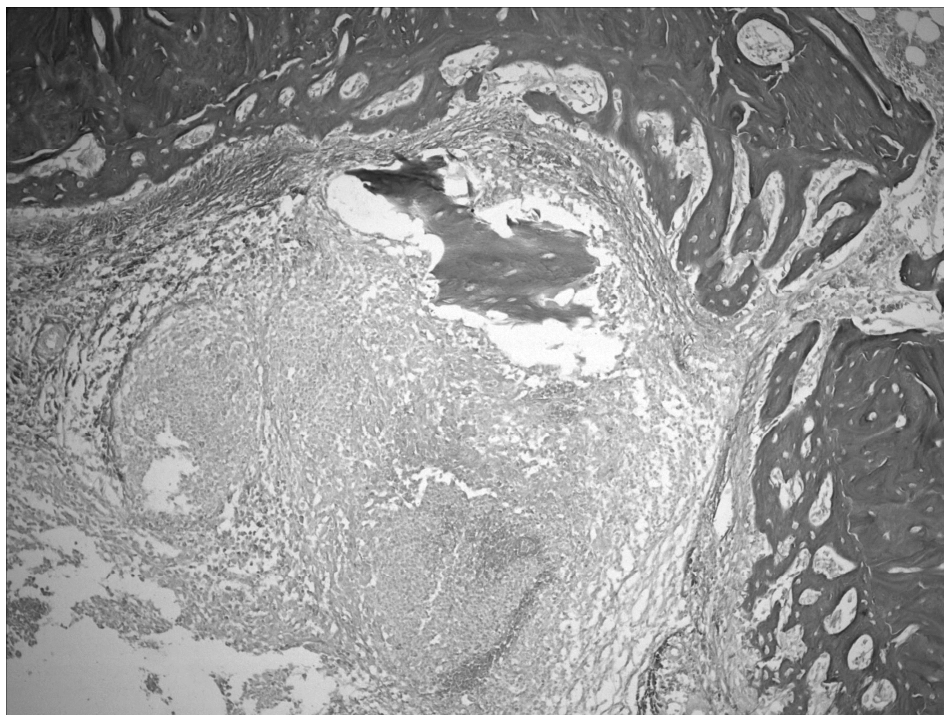


Рис. 2. Участок большеберцовой кости крысы через 3 мес. после инокуляции Золотистого стафилококка. Наличие костных осколков с погибшими остеocyтaми в зоне некроза. Окраска пикрофуксином по Ван Гизону. Ув. 100

Динамика и характер морфологических изменений большеберцовой кости в группах «ВО 2 мес.» и «ВО 3 мес.» не отличались от группы «В 2 мес.» и «В 3 мес.», что может служить подтверждением того, что используемая среда для приготовления водно-масляной эмульсии не оказывает влияния на течение воспалительного процесса.

Морфометрический анализ интенсивности окрашивания коллагеновых волокон, отражающей плотность их распределения в костных балках, оценивали у животных групп «В 2 мес.» и «ВО 2 мес.», а также «В 3 мес.» и «ВО 3 мес.». Было установлено, что на аналогичных сроках эксперимента в данных группах статистически значимых различий не наблюдалось (табл. 1).

Таблица 1

Интенсивность окрашивания коллагеновых волокон костной ткани в у.е. Ме (Q ₁ ; Q ₃)				
Показатель	«В 2 мес.»	«В 3 мес.»	«ВО 2 мес.»	«ВО 3 мес.»
Интенсивность окрашивания костной ткани	84,6 (65,7; 89,5)	70,0 (62,8; 79,2)	80,5 (72,8; 86,2)	73,3 (62,5; 80,3)

Примечание: группа «В 2 мес.» – через 2 месяца после инокуляции Золотистого стафилококка; группа «В 3 мес.» – через 3 месяца после инокуляции Золотистого стафилококка; группа «ВО 2 мес.» - через 2 месяца после инокуляции Золотистого стафилококка и введения *per os* масляной эмульсии; группа «ВО 3 мес.» - через 3 месяца после инокуляции Золотистого стафилококка и введения *per os* масляной эмульсии;

* - различия аналогичных сроков при $p < 0,05$.

При морфологическом исследовании группы «ВОБ 2 мес.» было обращено внимание на отсутствие зон некроза и существенное снижение зон инфильтрации. Причем, в отличие от группы «В 2 мес.», было отмечено, что изменился сам характер воспалительных инфильтратов, которые были представлены лимфоцитарно-макрофагальными элементами с существенным преобладанием последних, а также практически полное отсутствие гранулоцитов. Вместе с тем отмечалось выраженное формирование рыхлой волокнистой соединительной и грубоволокнистой костной тканей. Необходимо отметить, что содержание сульфатированных гликозаминогликанов в рыхлой волокнистой соединительной ткани было выше, чем в группе «В 2 мес.».

Со стороны костных балок отмечалась остеогенная резорбция кости, которая сочеталась с выраженным репаративным эндохондральным остеогистогенезом. Причем достаточно часто новообразованная костная ткань включала в себя фрагменты введенной в трепанационное отверстие хлопчатобумажной нити.

При морфологическом исследовании группы «ВОБ 3 мес.» отмечалось отсутствие зон некроза и инфильтрации, не выявлялась воспалительная реакция со стороны эндоста и периоста. Вместе с тем отмечалось выраженное формирование рыхлой волокнистой соединительной и грубоволокнистой костной тканей (рис. 3).

Морфометрический анализ интенсивности окрашивания коллагеновых волокон (табл. 2), отражающей плотность их распределения в костных балках у животных групп «В 2 мес.» и «ВОБ 2 мес.», показал, что она статистически значимо не различалась (что свидетельствовало об одинаковом уровне выраженности коллагенообразования в костных балках), но отличалась от группы интактных животных. Интенсивность окрашивания коллагеновых волокон в группах «В 3 мес.» и «ВОБ 3 мес.» статистически значимо различалась. При этом интенсивность окрашивания коллагеновых волокон в группе «ВОБ 3 мес.» и в группе интактных животных достоверно не отличалась, что свидетельствовало о практическом завершении эндохондрального остеогистогенеза.

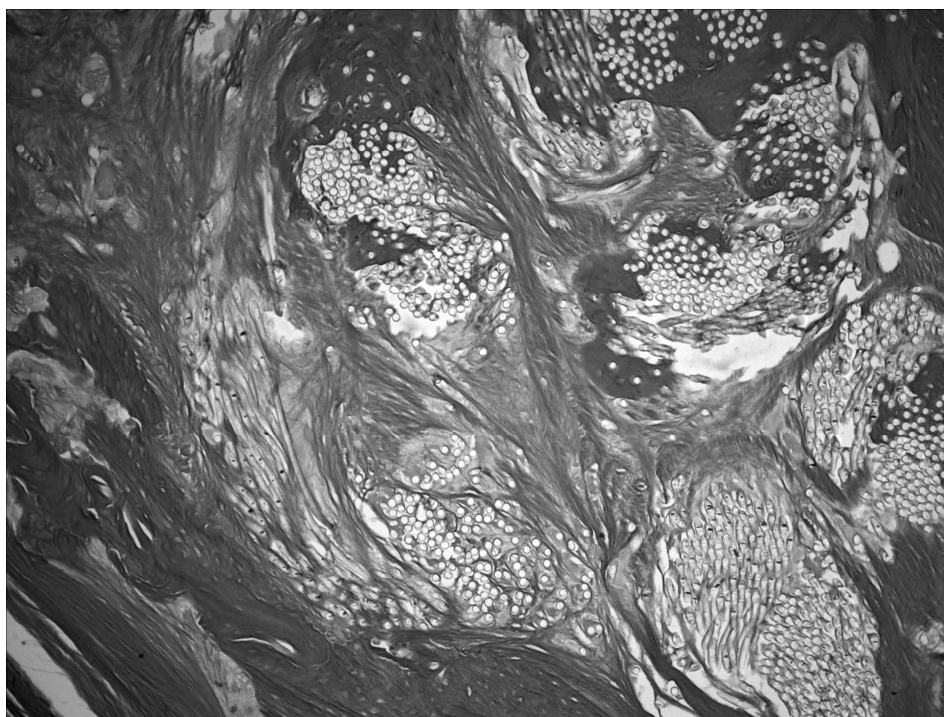


Рис. 3. Участок большеберцовой кости крысы через 3 мес. после инокуляции Золотистого стафилококка и введения *per os* масляной эмульсии бетамида. Формирование рыхлой волокнистой соединительной и грубоволокнистой костной тканей вокруг введенных в трепанационное отверстие нитей с культурой микроорганизмов. Окраска пикрофуксином по Ван Гизону. Ув. 100

Таблица 2

Интенсивность окрашивания коллагеновых волокон костной ткани в у.е. Ме (Q₁; Q₃)

Показатель	«В 2 мес.»	«В 3 мес.»	«ВОБ 2 мес.»	«ВОБ 3 мес.»	Инт.
Интенсивность окрашивания костной ткани	84,6 (65,7; 89,5)#	70,0 (62,8; 79,2)#	77,0 (69,8; 91,4)#	61,7 (49,2; 69,9)*	54,7 (48,0; 62,7)

Примечание: «В 2 мес.» – через 2 месяца после инокуляции Золотистого стафилококка; «В 3 мес.» – через 3 месяца после инокуляции Золотистого стафилококка; «ВОБ 2 мес.» - через 2 месяца после инокуляции Золотистого стафилококка и введения *per os* масляной эмульсии бетамида; «ВОБ 3 мес.» - через 3 месяца после инокуляции Золотистого стафилококка и введения *per os* масляной эмульсии бетамида; Инт. – интактные животные;

- различия с интактными животными при $p < 0,001$; * - различия интенсивности окрашивания коллагеновых волокон на аналогичных сроках при $p < 0,001$.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что β -аланиламид бетулоновой кислоты (бетаמיד) в дозе 50 мг/кг

1) предотвращает генерализацию воспалительного процесса, формирование обширных зон некроза и инфильтрации, остеокластическую резорбцию кости и формирование секвестров, что предотвращает хронизацию воспалительного процесса и способствует его разрешению;

- 2) способствует более раннему и более выраженному образованию рыхлой волокнистой соединительной и грубоволокнистой костной тканей, что свидетельствует о позитивном влиянии препарата на репаративные процессы;
- 3) вызывает ускоренное наступление фазы функциональной адаптации, способствуя более быстрому завершению репаративного эндохондрального остеогистогенеза с образованием зрелой костной ткани.

Список литературы

1. Гистохимическое и иммуногистохимическое исследование внеклеточного матрикса фиброзного кольца межпозвонковых дисков при моделировании стафилококковой инфекции / И.П. Жураковский [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. - 2013. - Т. 33, № 6. - С. 25-30.
2. Синтез и противовирусная активность амидов и конъюгатов бегулоновой кислоты с аминокислотами / О.Б. Флехтер [и др.] // Биоорганическая химия. – 2004. – Т. 30. - № 1. – С. 89–98.
3. Acute haematogenous osteomyelitis in children: is there any evidence for how long we should treat? / S. Weichert [et al.] // Curr Opin Infect Dis. - 2008. - Vol. 21, № 3. - P. 258-262.
4. Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in primary colorectal carcinomas and their related metastases on tissue sections and tissue microarray / F. Bibeau [et al.] // Virchows Arch. - 2006. - Vol. 449, № 3. - P. 281-287.
5. Diagnosis and management of chronic infection / A. Forsberg [et al.] // J Am Acad Orthop Surg. - 2011. - Vol. 19 (Suppl. 1). - P. S8–S19.
6. Infection / T. Miclau [et al.] // Orthop Trauma. - 2010. - Vol. 24. - P. 583–586.
7. Lazzarini L. Osteomyelitis in long bones / L. Lazzarini, J.T. Mader, J.H. Calhoun // J. Bone Joint Surg. Am. – 2004. – Vol. 86–A. – P. 2305–2318.
8. Lew D.P. Osteomyelitis / D.P. Lew, F.A. Waldvogel // Lancet. – 2004. – Vol. 364. – P. 369–379.
9. Ramos-Vara J.A. Technical aspects of immunohistochemistry // Vet Pathol. - 2005. - Vol. 42, № 4. - P. 405-426.
10. Trampuz A. Infections associated with orthopedic implants / A. Trampuz, A.F. Widmer // Curr Opin Infect Dis. - 2006. - Vol. 19. - P. 349–356.