

УДК 616.718.41-002.4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ АВАСКУЛЯРНОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Корыткин А.А., Захарова Д.В., Орлинская Н.Ю., Бугров С.Н., Тенилин Н.А., Новикова Я.С.

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: novikova_jana@mail.ru

Выполнен эксперимент по моделированию аваскулярного некроза головки бедренной кости на 17 кроликах. Экспериментальная модель была получена путем введения 0,3–0,4 мл 96 % спирта в головку бедренной кости лабораторного животного с доступом к тазобедренному суставу, максимально приближенным к операционному доступу, используемому в клинической практике при хирургическом вывихе головки бедренной кости. Было установлено, что очаг аваскулярного некроза у лабораторных животных развивается спустя 1 месяц после введения спирта в головку бедренной кости. Результаты проведенного экспериментального исследования доказывают эффективность предложенной модели аваскулярного некроза головки бедренной кости. Предложенная модель является малотравматичной и может быть использована для изучения свойств и оценки эффективности новых замещающих очаг некроза материалов, способов лечения данного заболевания.

Ключевые слова: экспериментальное исследование, аваскулярный некроз, тазобедренный сустав.

THE EXPERIMENTAL MODEL OF AVASCULAR NECROSIS OF THE FEMORAL HEAD

Korytkin A.A., Zakharova D.V., Orlynskaya N.Yu., Bugrov S.N., Tenilin N.A., Novikova Ya.S.

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, e-mail: novikova_jana@mail.ru

The experimental investigation for the purpose of modeling of avascular necrosis of the femoral head were performed on 17 rabbits. The experimental model was obtained by the introduction of 0,3-0,4 ml 96 % ethanol into the head of the femur of a laboratory animal with access to the hip joint, as close as possible to the used trapdoor in clinical practice during surgical dislocation of the femoral head. It was established that the zone of the avascular necrosis in laboratory animals develops 1 month after injection of ethanol in the head of the femur. The results of experimental studies prove the effectiveness of the proposed model of avascular necrosis of the femoral head. The proposed model is less traumatic and can be used to study the properties and evaluate the effectiveness of a new residual necrosis materials, methods of treatment of this disease.

Keywords: experimental investigation, avascular necrosis, hip joint.

Одним из приоритетных направлений работы экспериментальной лаборатории ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России является создание моделей заболеваний опорно-двигательного аппарата, усовершенствование имеющихся, разработка и внедрение в практику новых материалов и способов лечения патологии костей и суставов.

Большой интерес к экспериментальным моделям аваскулярного некроза головки бедренной кости (АНГБК) объясняется широкой распространенностью и высокой социальной значимостью данного заболевания [1-3]. Поскольку для применения новых способов лечения остеонекроза в клинической практике их эффективность должна быть доказана экспериментально на доклинических этапах исследования, разработка адекватной модели АНГБК является важной задачей.

В настоящее время в литературных источниках описывается большое количество

методик, моделирующих АНГБК у различных лабораторных животных (крысы, кролики, собаки и т.д.). В подавляющем большинстве работ моделирование остеонекроза выполняется путем удаления надкостницы, перевязки мышц проксимального отдела бедра, иссечения или перевязывания круглой связки, кругового иссечения капсулы тазобедренного сустава, применения лигатуры вокруг шейки бедренной кости, блокады артериального кровоснабжения путем введения талька, водной взвеси серебра и других веществ [4-6]. Широко используется моделирование стероидиндуцированного некроза головки бедренной кости у кроликов путем внутривенного введения липополисахарида 10 мкг/кг массы тела дважды, с интервалом 24 часа, и внутримышечной инъекцией метилпреднизолона 20 мг/кг массы тела три раза с интервалом 24 часа [7-9]. Существует методика создания некроза головки бедренной кости с использованием жидкого азота, с экспозицией в области головки в течение 3-х минут и дальнейшим отмыванием головки бедренной кости теплым физиологическим раствором [10]. Известен также способ моделирования АНГБК путем параартикулярного введения 0,1 % раствора адреналина в течение 20–30 дней через каждые 6 часов в количестве 0,1–0,3 мл [11].

Большинство существующих хирургических методик моделирования аваскулярного некроза головки бедренной кости достаточно травматичны, а при лекарственно-индуцированном АНГБК не исключен системный эффект препаратов на организм лабораторных животных.

Одной из основных задач при разработке экспериментальной модели аваскулярного некроза головки бедренной кости, учитывая необходимость повторного оперативного вмешательства на тазобедренном суставе для исследования различных свойств и эффективности применения новых материалов для пластики дефекта, являлось снижение травматичности и максимальное сходство с хирургическим доступом, используемым для лечения АНГБК в клинической практике [12].

Цель исследования – предложить экспериментальную модель аваскулярного некроза головки бедренной кости.

Материалы и методы исследования

Для моделирования аваскулярного некроза головки бедренной кости в качестве объекта исследования были отобраны 17 кроликов в возрасте 6 ± 1 месяцев с массой тела 3500 ± 500 грамм. Кролики были выбраны для проведения данного вида исследований благодаря своей доступности и анатомическим особенностям – размеры головок бедренных костей этих лабораторных животных являются оптимальными [13]. Эксперимент был одобрен решением локального этического комитета при ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России (выписка из протокола № 6 от 20 мая 2016) и проводился в соответствии с методическими

рекомендациями «Деонтология медико-биологического эксперимента», а также с соблюдением правил гуманного обращения с животными «Report of the AVMA Panel on Euthanasia». Согласно общепринятым этическим нормам, все болезненные манипуляции осуществлялись под общим и местным обезболиванием.

После обработки операционного поля антисептиками, лабораторному животному, находящемуся под наркозом, выполнялись разрез кожных покровов в проекции заднего края большого вертела и послойное разведение мышц. Добравшись до тазобедренного сустава, производилось рассечение капсулы сустава и вывихивание головки бедренной кости кзади с одномоментным пересечением круглой связки. С помощью шприца в головку бедренной кости кролика вводилось 0,3–0,4 мл 96 % спирта.

На первых этапах работы, при выведении лабораторных животных из эксперимента и исследовании головок бедренных костей, было выявлено наличие некроза параартикулярных тканей вследствие продолжающегося повреждающего действия на них спирта после ушивания раны. В связи с этим модель аваскулярного некроза головки бедренной кости была усовершенствована путем использования воска для закрытия места инъекции этанолом и последующего промывания операционного поля физиологическим раствором для удаления остатков спирта. На завершающем этапе проводилось вправление головки бедренной кости во впадину с последующим послойным ушиванием раны.

При выведении лабораторных животных из эксперимента в сроки 2, 4 и 8 недель (группы I, II и III, соответственно), полученный экспериментальный материал, фиксированный в 10 % формалине, декальцинировался в специальном декальцинирующем растворе (Биодек) при температуре 37 °С в течение 24 часов. Затем экспериментальный материал подвергался обезвоживанию в спиртах восходящей концентрации, начиная с 70 % спирта и до абсолютного. После помещения в ксилол материал подвергался заливке в парафин. Стандартная гистологическая проводка осуществлялась на аппарате «Excelsior ES» (Thermo Scientific). После проводки изготавливались парафиновые блоки с использованием заливочной станции «HistoStar» (Thermo Scientific). Серийные срезы толщиной 4–6 микрон получали на микротоме «Microm HM 325» (Thermo Scientific). Срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Для морфометрической обработки и создания видеоархива полученного экспериментального материала использовался микроскоп Leica DM 2500, объектив x4, x10, x20, x40, x100, окуляр x10.

Результаты исследования и их обсуждение

При макроскопическом исследовании экспериментального материала, полученного у животных I группы – через 2 недели после моделирования очага некроза по предложенной

малоинвазивной методике с использованием 96 % спирта – хрящевая поверхность головки бедренной кости ровная, гладкая, без видимых дефектов, однако суставной хрящ в предполагаемой зоне аваскулярного некроза темно-серого цвета, на разрезе губчатое вещество кости неравномерное (рис. 1).

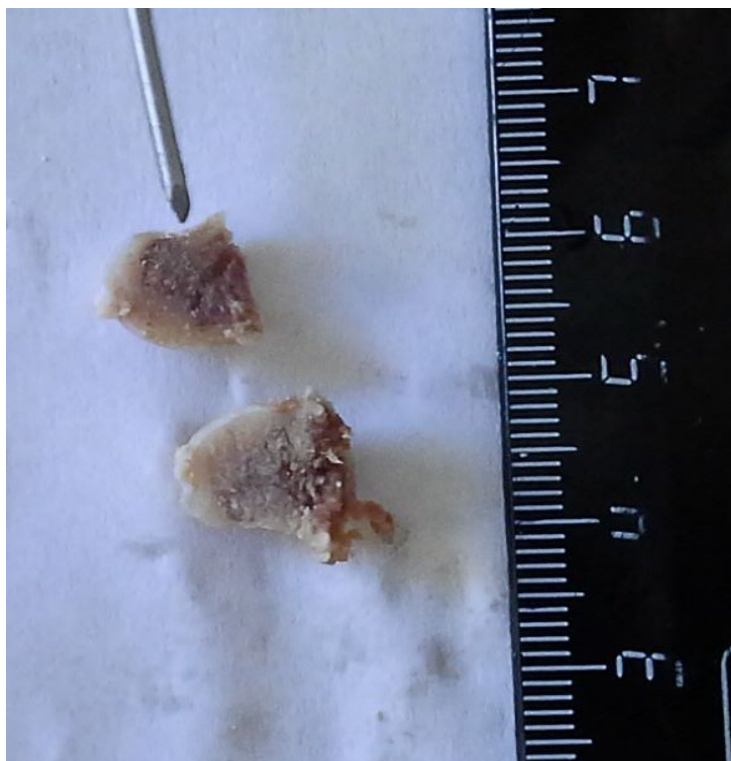


Рис. 1. Фрагмент головки бедренной кости кролика на 2 неделю после моделирования аваскулярного некроза (I группа животных)

При гистологическом исследовании экспериментального материала, полученного у животных, выведенных из эксперимента через 2 недели после воздействия спиртом, отмечено редкое расположение бесформенных костных балок с наличием небольшого количества островков энхондрального остеогенеза. В субламинарной зоне на препаратах головок бедренных костей животных I группы на фоне миелоидного костного мозга наблюдались альтеративные изменения костной ткани в виде формирования грубо-губчатой костной ткани и редкого расположения костных балок (рис. 2).

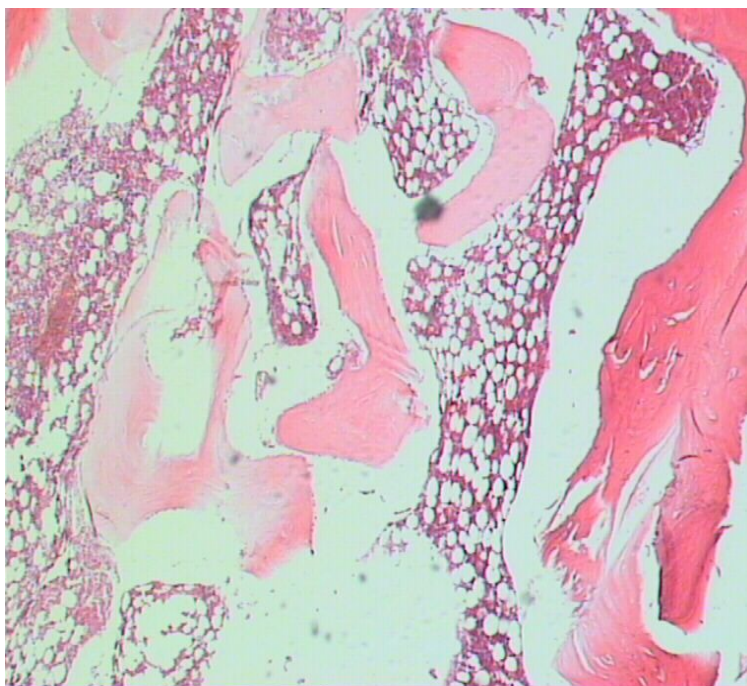


Рис. 2. Микропрепарат головки бедренной кости кролика через 2 недели после воздействия спиртом (I группа животных). Бесформенные костные балки среди миелоидного костного мозга. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x 200

Через 4 недели после воздействия спиртом макропрепараты головок бедренных костей кроликов II группы сохраняли сферическую структуру головки с деформацией суставного хряща, на разрезе с участком расплавления ткани (рис. 3).



Рис. 3. Фрагмент головки бедренной кости кролика на 4 неделю после моделирования аваскулярного некроза (II группа животных)

При гистологическом исследовании головок бедренных костей животных, выведенных из эксперимента через 4 недели после введения 96 % спирта (II группа), в толще головок бедренных костей субхондральные костные пластинки имели нечеткие границы (рис. 4).

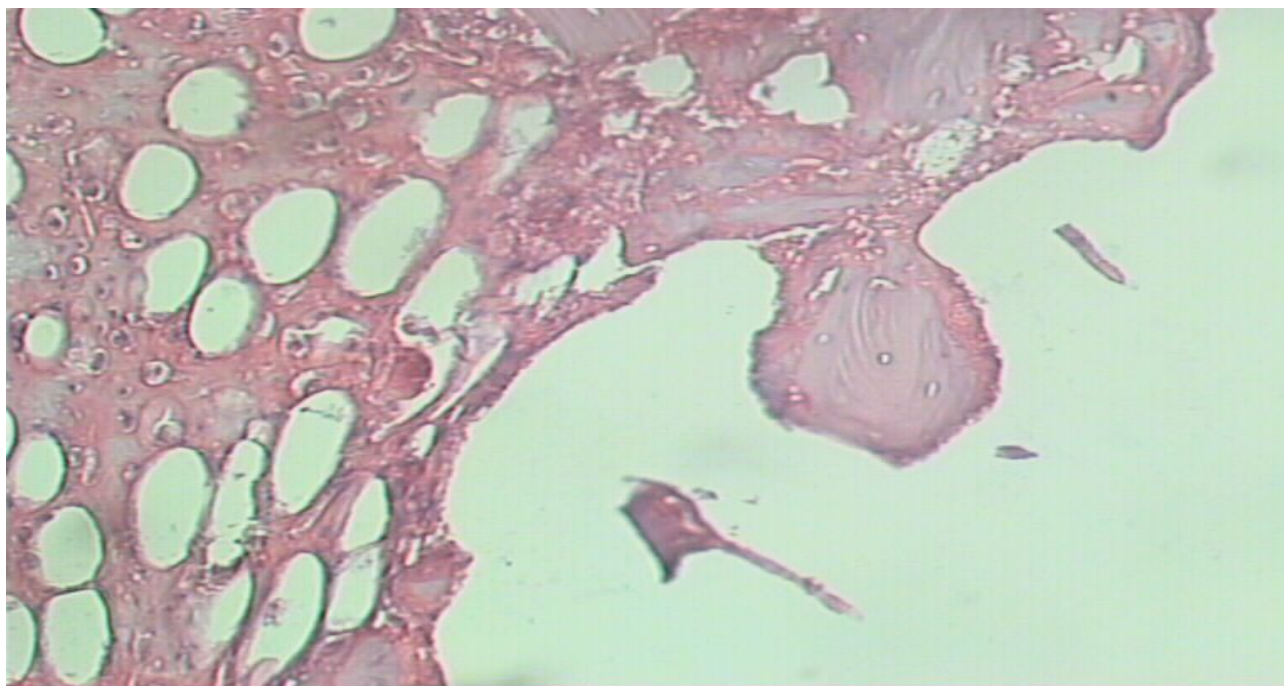


Рис. 4. Микропрепарат головки бедренной кости кролика через 4 недели после воздействия спиртом (II группа животных). Фрагменты грубогубчатой костной ткани безостеоцитными участками. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x 200

Через 1 месяц после моделирования аваскулярного некроза на микропрепаратах головок бедренных костей кроликов II группы в спонгиозе визуализировались полости, по краям которых располагались нежизнеспособные костные балки. В полостях отсутствовали костные структуры. Также наблюдались фрагменты грубогубчатой костной ткани с безостеоцитными участками и хорошо различимыми произвольно ориентированными линиями склеивания на фоне мертвой костной ткани (рис. 4).

Исследование экспериментального материала, полученного у кроликов, выведенных из эксперимента через 8 недель после введения 96 % спирта, на поверхности головки бедренной кости, в которой проводилось моделирование АНГБК по предложенной методике, показало, что головка бедренной кости лабораторных животных III группы имеет сероватый оттенок в зоне моделирования, хрящевая поверхность тусклая, шероховатая (рис. 5).



Рис. 5. Фрагменты головки бедренной кости кролика на 8 неделю после моделирования асептического некроза (III группа животных)

При гистологическом исследовании срезов головок бедренных костей лабораторных кроликов III группы через 8 недель после воздействия этанолом отмечено утолщение костных балок, а также наличие между ними нежной ретикуло-фиброзной ткани, что наглядно проиллюстрировано на рисунке 6. В имеющихся костных балках наблюдалось большое количество остеоцитов с широкими лакунами (рис. 6).

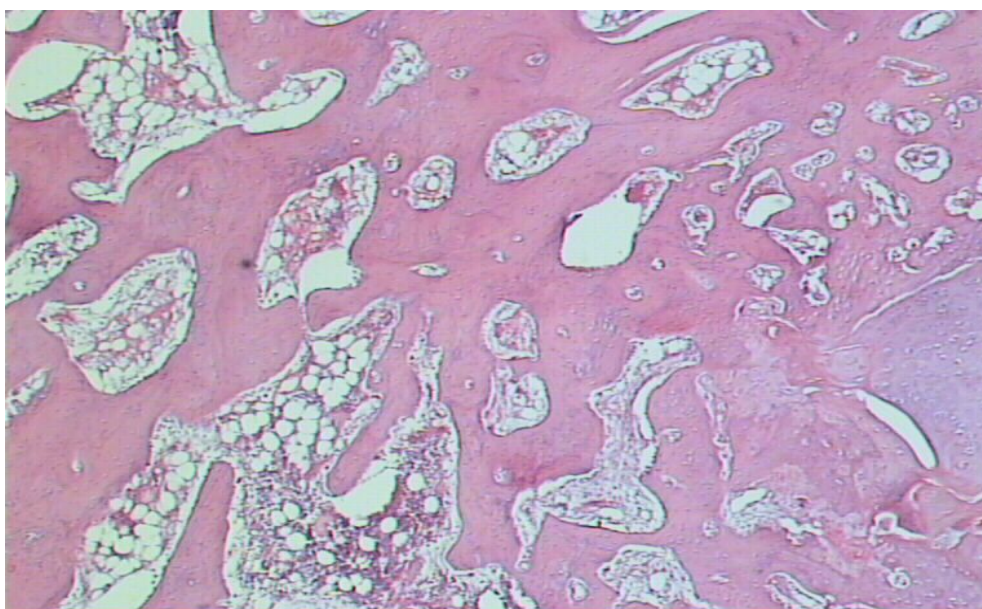


Рис. 6. Микропрепарат головки бедренной кости кролика через 8 недель после воздействия спиртом (III группа животных). Утолщенные костные балки и активное формирование костной ткани путем энхондрального остеогенеза. Окраска гематоксилин-эозином.

Увеличение x 200

Заключение

Разработанная модель аваскулярного некроза головки бедренной кости является наиболее адекватной и обладает рядом преимуществ относительно других существующих экспериментальных моделей остеонекроза. Она является малотравматичной, то есть наносит меньше вреда лабораторным животным и выполняется с использованием доступа, максимально приближенного к хирургической практике при выполнении органосохраняющих оперативных вмешательств у пациентов с данной патологией.

Гистологически подтверждено, что через 4 недели после воздействия 96 % спиртом наблюдаются начальные проявления аваскулярного некроза головки бедренной кости, оптимальным сроком для дальнейшего исследования свойств и оценки эффективности новых материалов, предполагающих их дальнейшее использование в клинической практике для замещения очага некроза, являются 4 недели от момента введения спирта экспериментальным животным по предложенной схеме. Результаты проведенного экспериментального исследования доказывают эффективность предложенной модели АНГБК.

Список литературы

1. Эффективность использования биорезорбируемых материалов для заполнения костных полостей при остеонекрозе головки бедренной кости / В.А. Конев [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2014. – № 3. – С. 28-38.
2. Данные регистра эндопротезирования тазобедренного сустава РНИИТО им. Р.Р. Вредена за 2007-2012 годы. / Р.М. Тихилов [и др.] // Травматология и ортопедия России. — 2013. – № 3. – С. 167-190.
3. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells associated with tantalum rod implantation and vascularized iliac grafting for the treatment of end-stage osteonecrosis of the femoral head / D. Zhao [et al.] // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-9.
4. Попов И.В. Современные взгляды на этиологию, патогенез и принципы лечения остеохондропатии головки бедренной кости — болезни Легга – Кальве – Пертеса (обзор литературы) / И.В. Попов // Травматология и ортопедия России. – 2002. – № 2. – С. 59-66.
5. Шумада И.В. Об асептическом некрозе и кистовидной перестройке эпифизов костей у взрослых / И.В. Шумада // Ортопедия, травматология. – 1980. – № 7. – С. 33-37.
6. Богосьян А.Б. Дифференцированный подход к выбору лечения асептического некроза головки бедренной кости в зависимости от стадии болезни (экспериментальное исследование) /А.Б. Богосьян // Дегенеративные заболевания суставов и позвоночника: сб.

науч. тр. – Л., 1984. – С. 15-19.

7. Model establishment, MRI and pathological features of early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit / L. Zhang [et al.] // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* – 2015. – Vol. 29, № 10. – P. 1240-1243.

8. Nitric oxide content and apoptosis rate in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head / R. Bai [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine.* – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. 591-597. DOI:10.3892/etm.2015.2521.

9. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor prevents steroid-associated osteonecrosis of the femoral head in rabbits by promoting angiogenesis and inhibiting apoptosis / L. Fan [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 9.; URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0107774> (дата обращения: 10.06.2017).

10. Treatment of early avascular necrosis of femoral head by small intestinal submucosal matrix with peripheral blood stem cells / H.J. Song [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2011. – Vol. 43. – P. 2027-2032. DOI:10.1016/j.transproceed.2010.12.060.

11. Беренштейн С.С. Способ моделирования асептического некроза головки бедренной кости / С.С. Беренштейн // *Ортопедия, травматология.* – 1993. – № 2. – С. 35-36.

12. Руководство по хирургии тазобедренного сустава / ред. Р.М. Тихилов, И.И. Шубняков. – СПб.: РНИИТО им. Р.Р. Вредена, 2014. – Т. 1. – 368 с.

13. Экспериментальная модель хронической гнойной костной полости / О.П. Живцов [и др.] // *Современные проблемы науки и образования.* – 2015. – № 6.; URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23642> (дата обращения: 19.06.2017).