

УДК: 616.314.18-002-018

© Поворознюк В.В., Климовицкий Ф.В., Дедух Н.В., 2013

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ТРАНСКОРТИКАЛЬНОГО МЕТАДИАФИЗАРНОГО ДЕФЕКТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЖИВОТНЫХ АЛЬФАКАЛЬЦИДОЛОМ

Поворознюк В.В., *Климовицкий Ф.В., **Дедух Н.В.

ГУ «Институт геронтологии НАМН Украины им. Д.Ф. Чеботарева»; *НИИ травматологии и ортопедии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького; **ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко»

Проблема регенерации кости постоянно находится в поле зрения ортопедов и травматологов. Тяжелые травматические повреждения костей, реконструктивно восстановительные операции на позвоночнике, эндопротезирование, замещение костных полостей синтетическими материалами, использование различных фиксирующих устройств и изучение их поведения в костной ткани тесно связаны с изучением механизмов репаративного остеогенеза [1]. Имеется обширная доказательная база, что различные заболевания человека, в том числе и остеопороз, приводят к замедлению или нарушению репаративного остеогенеза [2,3,4]. Познание механизмов регенерации и дисрегенерации костной ткани способствует выбору адекватной медикаментозной терапии [5,6,7]. Экспериментальные исследования на животных позволяют раскрыть механизмы и обосновать влияние различных медикаментозных препаратов на заживление перелома. На протяжении многих лет внимание исследователей было обращено на выяснение действия на костную ткань витамина Д и его активных метаболитов, применяемых для лечения остеопороза и переломов.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния альфакальцидола на регенерацию кости у животных с экспериментально моделированным путем овариоэктомии остеопорозом.

Материал и методы исследования. *Моделирование остеопороза.* На 20 белых лабораторных крысах (исходной массой 200 г) популяции института ГУ «Институт геронтологии НАМН Украины» воспроизводили модель постменопаузального остеопороза. В операционной в стерильных условиях после премедикации и введения животного в наркоз, его фиксировали на специальных подставках в положении на спине. После обработки операционного поля – нижней трети живота раствором йода, выполняли поперечный разрез кожи до 1,5 см. Отделяли кожу от брюшины, из межмышечного бокового доступа пинцетом выделяли рога матки, перевязывали их шовной нитью и отсекали яичники. Накладывали швы. После оперативного вмешательства животные получали антибиотики и обезболивающие препараты.

Эксперименты на животных выполнены в соответствии с требованиями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других целях» и Закона Украины [8,9]. План эксперимента и тактика его выполнения заслушаны и утверждены Комитетом по вопросам биоэтики ГУ «Институт геронтологии НАМН Украины».

Через 5 месяцев после овариоэктомии, на

фоне развившегося у животных остеопороза [10] моделировали сквозной дефект в области дистального метадиафиза бедренной кости. Оперативное вмешательство выполняли под общим внутримышечным наркозом (аминазин – 10 мг/кг, кетамин – 50 мг/кг) в условиях асептики. Для моделирования дефекта латеральным доступом выполняли разрез кожи, тупым распатором раздвигали мышцы и с помощью зубохирургического бора диаметром 1 мм воспроизводили транскортикальный сквозной дефект. Область травматического повреждения обрабатывали сухим антибиотиком (пенициллин) и ушивали кожу.

Животные в послеоперационном периоде находились под постоянным наблюдением.

После выполнения оперативного вмешательства лечение животных проводили альфакальцидолом (препарат Алфа Д3-Тева, 0,1 мкг/кг веса) по разработанному схематическому в двух сериях эксперимента.

1 серия – воспроизведение травматического повреждения у овариоэктомированных крыс;

2 серия эксперимента – воспроизведение травматического повреждения у овариоэктомированных крыс и лечение альфакальцидолом.

Животных выводили из эксперимента через 10 и 30 суток путем передозировки эфира для наркоза. На каждый срок исследования во всех сериях выведено из эксперимента по 5 животных.

Альфакальцидол вводили крысам *per os* утром в суспензии дистиллированной воды, начиная с 2-х суток после операции на протяжении всего срока исследования.

Гистологические исследования. Для гистологических исследований бедренную кость крыс с областью травматического повреждения и фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, декальцинировали в растворе 4 % азотной кислоты, обезживали в спиртах возрастающей крепости и заключали в целлоидин [11]. Изготавливали гистологические срезы на санном микротоме «Reichert», окрашивали их гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по Ван-Гизон. Окрашенные срезы анализировали в микроскопе MICROS. Фотографировали препараты с помощью цифровой фотокамеры Canon EOS-300D под микроскопом «AxioStar Plus».

Морфометрические исследования выполняли для сравнительного анализа динамики формирования костного регенерата на различные сроки исследования. Определяли ткани, заполняющие область травматического повреждения по территории дефекта. Исследовали относительную площадь (на срезе) новообразованных тканей (фиброретику-

лярной и костной) в области межотломковой щели по срокам наблюдения с помощью квадратно-сетчатой окулярной вставки с 289 точками по методике Автандилова Г.Г. [12]. Морфометрические исследования регенерата выполняли на 5 животных (на каждый срок), оценивали по два среза, полученные от одного животного.

Цифровые показатели были обработаны статистически по Стьюденту.

Результаты собственных исследований и обсуждение. У животных с моделированным остеопорозом, травматическим повреждением бедренной кости и леченных альфакальцидолом при микроскопическом исследовании на 10 сутки выявлено, что зона повреждения представлена узкой щелью, заполненной регенератом, проходящим сквозь два кортикальных слоя метадиафиза бедренной кости. Регенерат описан со стороны латеральной и медиальной областей дефекта.

В латеральной части (в области разреза кожи и введения бора в костную ткань) на кортексе материнской кости формируется мощный периостальный и эндостальный регенераты, представленные губчатой костью с утолщенными костными трабекулами, на поверхности которых высокая плотность остеоцитов (рис. 1). Периостальный регенерат полностью перекрывает область травматического повреждения. Учитывая его физиологическую роль в стабилизации фрагментов кости, формирование этой структуры способствует упрочнению регенерата и материнской кости на ранние сроки репаративного остеогенеза.



Рис. 1. Новообразованная грубоволокнистая костная ткань в области травматического повреждения. Периостальный регенерат над областью повреждения. 1 серия эксперимента. Животные, леченные альфакальцидолом. 10 сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 100.

В отличие от остеоцитов, остеобласты располагаются на поверхности кости, они не окружены капсулами. Костные трабекулы заполняют полностью посттравматическую щель, по направленности отличаются от таковых губчатой материнской кости. Они прорастают из губчатой кости, имеют направление перпендикулярное к кортексу. Между костными трабекулами в межтрабекулярных пространствах определяется фиброретикулярная ткань с высокой плотностью клеток фибробластического дифферона (рис. 1). Новообразованная костная ткань регенерата плотно располагается на поверхности фрагментов кортекса, прилежащих к области травматического повреждения, что способствует соединению регенерата с отломками.

Регенерат на медиальной стороне беренной кости, в интермедиарной зоне и прилежащей

эндостальной областях, также представлен густой сетью грубоволокнистых новообразованных костных трабекул с высокой плотностью остеоцитов и остеобластов (рис. 2). Костные трабекулы располагаются в поперечном направлении по отношению к оси конечности, между ними встречаются небольшие участки фиброретикулярной ткани. Над областью дефекта формируется надкостница, представленная плотными пучками коллагеновых волокон с низкой плотностью фибробластов.

Кортекс, непосредственно прилежащий к области травматического повреждения, с признаками реактивной перестройки – с участками без остеоцитов, напластованиями новообразованной кости, узкими костно-мозговыми пространствами, заполненными ретикулофиброзной тканью.

У животных с экспериментально моделированным остеопорозом без лечения на 10 сутки исследования по латеральной области бедренной кости между фрагментами кортекса регенерат представлен фиброретикулярной тканью, перемежающейся с редко расположенными новообразованными костными трабекулами (рис. 3). Фиброретикулярная ткань представлена фибробластами различной зрелости, между которыми находятся малодифференцированные стромальные клетки. Плотность кровеносных сосудов в фиброретикулярной ткани низкая. Аналогичные данные были получены другими авторами при изучении регенерации на фоне алиментарного остеопороза [13].

По медиальной поверхности в травматически воспроизведенной щели регенерат, располагающийся в интермедиарной зоне и в эндостальной области представлен фиброретикулярной и новообразованной грубоволокнистой костной тканью (рис. 4). Над областью травматического повреждения располагается периост, представленный редко расположенными пучками коллагеновых волокон.

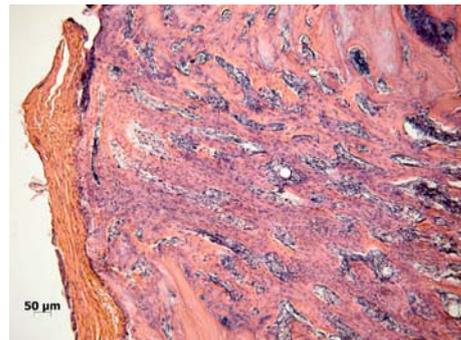


Рис. 2. Новообразованная костная ткань в области травматического повреждения. 1 серия эксперимента. Животные, леченные альфакальцидолом. 10 сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 100.

На 30 сутки у животных, леченных альфакальцидолом, со стороны латеральной и медиальной поверхностей бедренной кости регенерат полностью заполняет травматическую щель, тесно спаян с кортексом и ниже расположенной губчатой костью. В области кортекса имеет место компактизация костной ткани регенерата. Костные структуры становятся едиными и непрерывными. Сформирована пластинчатая кость, в толще которой обнару-

живаються прободаючі кровеносні суди малого калібру (рис. 5). Щільність остеоцитів в новообразованій костній тканинній високій.

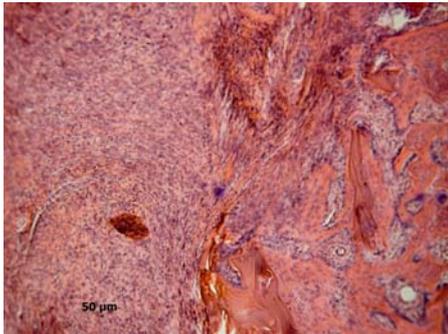


Рис. 3. Фіброретикулярна тканина, перемежаюча з новообразованими костними трабекулами. 2 серія експеримента. 10 сутки. Гематоксилін і еозин. Ув. 100.

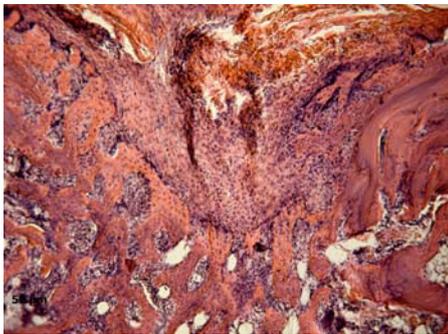


Рис. 4. Фіброретикулярна тканина. Сеть волокнистих костних трабекул. 2 серія експеримента. 10 сутки. Гематоксилін і еозин. Ув. 100.

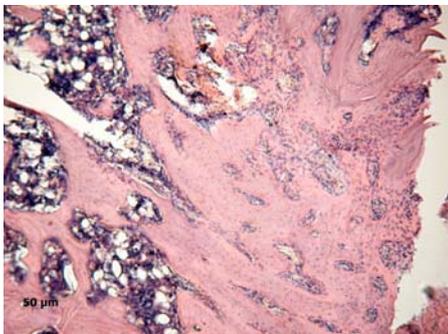


Рис. 5. Костний регенерат в області травматичного пошкодження. Медіальна область бедренної кістки. 1 серія. 30 сутки. Гематоксилін і еозин. Ув. 100.

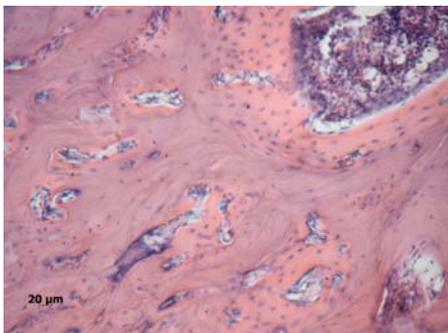


Рис. 6. Аппозиційне напластування костної тканини на поверхності материнської кістки, оточуючої костномозгові простірства. 1 серія. 30 сутки. Гематоксилін і еозин. Ув. 200.

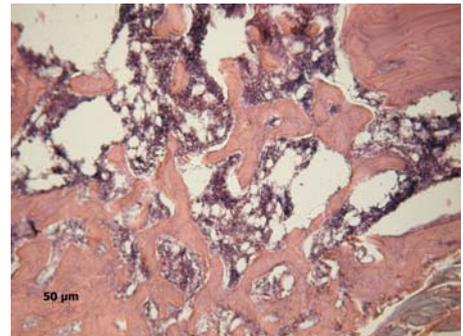


Рис. 7. Костні трабекули в області травматичного пошкодження. Латеральна сторона бедренної кістки. 2 серія експеримента. 10 сутки. Гематоксилін і еозин. Ув. 100.

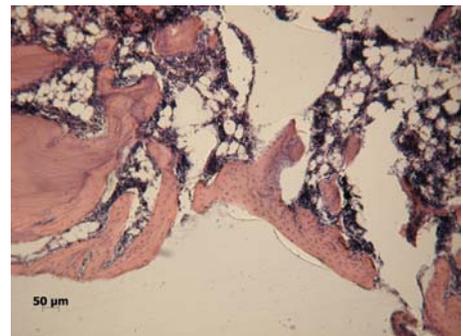


Рис. 8. Костні трабекули в області травматичного пошкодження. Медіальна сторона бедренної кістки. 2 серія експеримента. 10 сутки. Гематоксилін і еозин. Ув. 100.

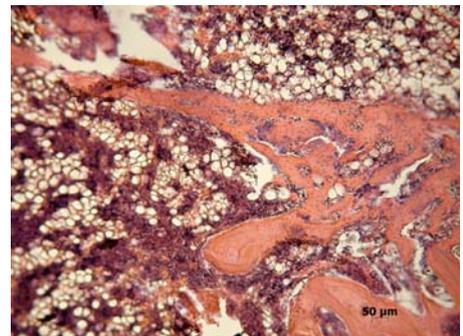


Рис. 9. Центральна область дефекта. Узкі новообразовані костні трабекули. Очаги червоного і жовтого костного мозку. 2 серія експеримента. 30 сутки. Гематоксилін і еозин. Ув. 100.

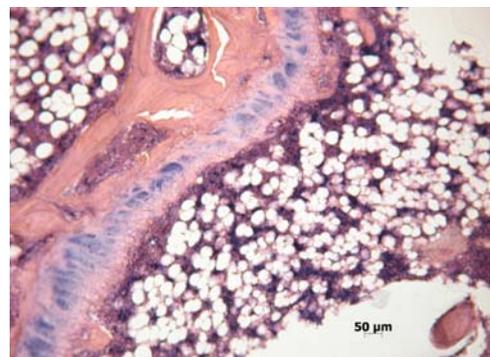


Рис. 10. Відсутність костних трабекул в області, подлягачій к зоні росту. 2 серія експеримента. 30 сутки. Гематоксилін і еозин. Ув. 100.

Периостальний регенерат зберігається тільки на латеральній стороні бедренної кістки.

В области травмированной губчатой кости обнаруживается формирование грубоволокнистых костных трабекул.

В кортексе, прилежащем к области травматического повреждения, обнаруживаются выраженные репаративные проявления, заключающиеся в аппозиционном напластовании костной ткани на поверхность материнской кости, окружающей костно-мозговые пространства (рис. 6). Костная ткань в виде концентрических окружностей, напластовываясь на материнскую кость, способствует сужению расширенных сосудистых каналов и резорбционных полостей. Новообразованная костная ткань с высокой плотностью остеоцитов на поверхности, которые имеют округлые слабобазофильные ядра, что свидетельствует об их функциональной активности. Формирование таких участков способствует упрочнению костной ткани.

На 30 сутки у нелеченных животных регенерат в интермедиарной области, как с медиальной, так и с латеральной стороны бедренной кости, представлен разрозненными костными трабекулами с низкой плотностью остеоцитов. Между костными трабекулами располагаются очаги

красного и желтого костного мозга и обширные псевдокистозные полости (рис. 7 и рис. 8), формирование которых может быть связано с нарушением внутрикостного давления при нагрузке на функционально неполноценную кость.

В центральной области дефекта, проходящего через губчатую кость, среди очагов красного и желтого костного мозга обнаруживаются узкие новообразованные костные трабекулы (рис. 9). В целом, у животных после овариэктомии плотность костных трабекул в метадиафизарной области низкая и на значительных территориях отсутствует (рис. 10).

В кортексе, прилежащем к области травматического повреждения, по сравнению с предыдущими сутками, преобладают деструктивные нарушения.

Для объективизации данных гистологического исследования на 30 сутки было проведено морфометрическое исследование относительного объема костной ткани регенератов, расположенных в области кортекса со стороны медиальной и латеральной сторон бедренной кости у леченных и нелеченных животных. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Относительный объем (%) новообразованной костной ткани в смоделированных костных дефектах крыс на 30 сутки исследования (по 5 животных, n=10 в каждой серии)

*Серии эксперимента	Костная ткань	Фиброретикулярная ткань, костный мозг
Регенерат в области кортекса (латеральная сторона бедренной кости)		
Серия 1	70,6±3,23	28,3±2,29
Серия 2	48,3±4,4 P < 0,001	51,7±5,07 P < 0,001
Регенерат в области кортекса (медиальная сторона бедренной кости)		
Серия 1	76,0±3,03 P1 > 0,05	24,0±1,99 P1 > 0,05
Серия 2	36,4±5,28 P < 0,001 P1 < 0,05	63,6±2,11 P < 0,001 P1 < 0,001

Обозначения: * 1 серия –травматическое повреждения у овариэктомированных крыс и лечение альфакальцидолом; 2 серия эксперимента – травматического повреждения у овариэктомированных крыс без лечения. P – достоверность отличия показателей леченных животных 1 серии с показателями животных 2 серии; P1 - достоверность отличия показателей в латеральной и медиальной области сторон бедренной кости.

Анализ тканей, формирующих регенерат – костной и сочетания фиброретикулярной с костным мозгом, показал, что показатели костной ткани в регенератах леченных животных значительно превосходят таковые у нелеченных животных. Так, у животных, леченных альфакальцидолом на фоне травматического повреждения после овариэктомии, площадь костной ткани в регенерате в латеральной области бедренной кости была увеличена в 1,46 раза по сравнению с животными, не получавшими лечения. Достоверные отличия выявлены и по показателю фиброретикулярной ткани и костного мозга, площадь которых в регенератах у нелеченных животных была больше в 1,8 раза по сравнению с

животными, леченными альфакальцидолом.

Выявлено, что на 10 сутки после воспроизведения травматического повреждения бедренной кости и лечения овариэктомированных животных альфакальцидолом в области травматического повреждения формируется костная ткань, представленная грубоволокнистыми костными трабекулами, в то время как у нелеченных животных в регенератах площади, занимаемые фиброретикулярной костной тканью и костным мозгом, значительно больше по сравнению с леченными животными. У леченных животных на 30 сутки костные структуры регенерата достаточно зрелые по сравнению с контрольной группой.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Климовицкий В.Г. Возможные пути оптимизации репаративных процессов у пострадавших с переломами длинных конечностей (взгляд на проблему)// В.Г. Климовицкий, В.Н. Пастернак, В.М. Оксимец // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. –№ 1. – С.90-99.
2. Корж Н.А., Дедух Н.В. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему: стадии

регенерации / Н.А. Корж, Н.В. Дедух // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С.77-84.

3. **Корж Н.А., Дедух Н.В., Никольченко О.А.** Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Системные факторы, влияющие на заживление перелома / Н.А. Корж, Н.В. Дедух, О.А. Никольченко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – №2. – С.93-99.

4. **Augat P., Simon U., Liedert A.** Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone / P/ Augat, U.Simon, A. Liedert // Osteoporosis Int. – 2005. – Vol.16. – P.36-43.

5. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Медикаментозные препараты, оптимизирующие репаративный остеогенез / **Н.А. Корж, Л.Д. Горидова, Н.В. Дедух, К.К. Романенко** // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – №3. – С.85-92.

6. **Дедух Н.В.** Регенерация костного дефекта при введении животным препарата остеогенон // Дедух Н.В., Дурсунов А.М., Малишкіна С.В. // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2004. – №2. – С.40-45.

7. Влияние «Бивалоса» на репаративную регенерацию кости: данные экспериментальных и клинических исследований / **В.В. Поворознюк, Н.А. Корж,**

Н.В. Григорьева, Ф.В. Климовицкий // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2012. – Т. 1, № 586. – С. 5–12.

8. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – (Міжнародний документ Ради Європи). – Режим доступу до документа: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994137>.

9. Закон України №3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Стаття 26).

10. Экспериментальный остеопороз/ **В.В. Поворознюк, Н.В. Дедух, Н.В. Григорьева, И.В.Гопкалова** // Киев. – 2012. – 228 с.

11. **Саркисов Д.С.** Микроскопическая техника / Д.С.Саркисов, Ю.Л.Перова. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.

12. **Автандилов Г.Г.** Медицинская морфометрия. Руководство.- М.: Медицина, 1990.- 384 с.

13. **Дедух Н.В., Никольченко О.А.** Регенерация кістки при аліментарному остеопорозі експериментальне (дослідження) Ортопедия, травматология и протезирование. -2009. - № 2. – С. 34-40.

Поворознюк В.В., Климовицкий Ф.В., Дедух Н.В. Морфологические особенности регенерации транскортикального метадиафизарного дефекта при лечении животных альфакальцидолом // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 35-39.

В работе представлены результаты экспериментального исследования, в котором методами гистологии и морфометрии, оценен репаративный остеогенез после лечения овариоэктомированных крыс альфакальцидолом и у крыс, не получавших лечения. Анализ результатов исследования позволил сделать вывод, что лечение животных альфакальцидолом способствовало формированию мощного периостального и эндостального регенерата, упрочняющего костную ткань, так как в условиях овариоэктомии имеет место редукция губчатой кости и, соответственно, снижение ее прочностных качеств.

Ключевые слова: остеопороз, альфакальцидол, репаративный остеогенез, эксперимент

Поворознюк В.В., Климовицкий Ф.В., Дедух Н.В. Морфологічні особливості регенерації транскортикального метадиафизарного дефекту при лікуванні тварин альфакальцидолом // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 35-39.

У роботі наведені результати експериментального дослідження, у якому методами гистології та морфометрії, дана оцінка репаративному остеогенезу після лікування щурів, яким було проведено овариоэктомію, альфакальцидолом та щурів, які не отримували лікування. Аналіз результатів лікування дозволяє зробити висновок, що лікування тварин альфакальцидолом сприяє формуванню міцного периостального і ендостального регенерата, який упрочнює кісткову тканину, тому що в умовах овариоэктомії має місце редукція губчатой кістки і, відповідно, зниження її міцності.

Ключеві слова: остеопороз, альфакальцидол, репаративний остеогенез, експеримент.

Povoroznyuk V.V., Klimovitskiy F.V., Dedukh N.V. Morphological peculiarities of transcortical metadiaphysal defect regeneration when treating animals with alfalcidol // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 35-39.

The work contains results of experimental research where restorative osteogenesis on the example of spayed rats, treated with alfalcidol and those untreated at all, was evaluated through histological and morphometrical methods. Analysis of the results allowed making conclusion that alfalcidol treatment made for formation of strong periosteal and endosteal regenerated material strengthening bone tissue, as there takes place reduction of spongy bone and, correspondently, decrease of its strength qualities in spay conditions.

Key words: osteoporosis, alfalcidol, restorative osteogenesis, experiment.

Надійшла 14.11.2012 р.
Рецензент: проф. В.К.Івченко