

**Шилин В.А., Сафронов А.А., Кожанова Т.Г.**  
Оренбургский государственный медицинский университет  
E-mail: shilin1983@mail.ru

## **СТИМУЛЯЦИЯ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МОДЕЛИ ЛОЖНОГО СУСТАВА У КРЫС**

**Ложные суставы наблюдаются в 16–40% случаев от переломов длинных трубчатых костей. Данная патология наблюдается у лиц молодого возраста. Применяемые методики хирургического лечения характеризуются высоким процентом неудач.**

**Использование гидроксиапатит-коллагенового комплекса «ЛитАр» в эксперименте на крысах показало его высокую эффективность при стимуляции репаративного остеогенеза. Иммуногистохимический метод позволил количественно определить пролиферативную активность остеобластов в опыте по сравнению с группой контроля.**

**Применение препарата «ЛитАр» усиливает процессы остеогенеза. Механизм действия связан с увеличением активности бластных клеток и стимуляцией ангиогенеза.**

**Ключевые слова:** стимуляция остеогенеза, ложный сустав, «ЛитАр», гидроксиапатит.

Проблеме лечения ложных суставов посвящено большое количество научных исследований, многообразны применяемые методики хирургического лечения. На долю лиц трудоспособного возраста приходится до 52,3% данной патологии. Экономические затраты на лечение данных пациентов значительны [2]. Неудовлетворительные исходы лечения несросшихся переломов длинных трубчатых костей составляют от 16 до 40% [1]. По данным Тау W.H. et al. [12] возврат пациентов к нормальному образу жизни после хирургического лечения замедленно срастающихся и несросшихся переломов бедренной и большеберцовой костей составляет более года.

Применяемые способы лечения данных осложнений также характеризуются высоким процентом неудач. Как правило, требуется длительная иммобилизация оперируемого сегмента, наносится дополнительная травма, связанная с забором аутокости. Все это приводит к увеличению сроков нетрудоспособности пациентов, неоднократности оперативных пособий [10].

В настоящее время для лечения ложных суставов, дефектов костей ряд авторов предлагают использовать факторы роста, костные имплантаты.

Одним из перспективных направлений в стимуляции репаративной регенерации костной ткани является применение препаратов на основе гидроксиапатита кальция [3]. Гидроксиапатит (ГА) является биологически активным материалом. Он поддерживает вра-

стание кости и вызывает остеointegrацию при его применении в травматологии, стоматологии, обладает высокой биосовместимостью.

С биохимической точки зрения кость представляет собой нанокompозит, главным образом состоящий из гидроксиапатита и коллагена. Поэтому применение препаратов ГА может потенциально улучшать биосовместимость и механические характеристики применяемых имплантов.

В последние годы для замещения дефектов костной ткани в стоматологии, при лечении остеомиелитических очагов, костных опухолей с успехом используется наноразмерный композитный материал «ЛитАр» российского производства [6].

Препарат «ЛитАр» представляет собой гидроксиапатит-коллагеновый композит, полученной путем направленной диффузии ионов в пространство коллагеновых волокон. Направленная диффузия позволила получить наноразмерный состав препарата [7].

Препарат обладает сверхбыстрой биодеградацией по сравнению с известными композитами. Срок ее составляет от 2 до 3 недель. Обеспечивается такая скорость резорбции 70% порозностью препарата. Это способствует ангиогенезу в зоне нахождения препарата.

При этом авторы отмечают стимулирующее действие препарата на процессы регенерации костной ткани.

Целью исследования явилось изучение влияния композитного препарата «ЛитАр» на репаративный остеогенез в эксперименте.

### Материалы и методы

Экспериментальные исследования по изучению действия препарата «ЛитАр» выполнены на 30 лабораторных белых крысах массой тела 230–260 г.

В условиях экспериментальной лаборатории была создана модель ложного сустава бедренной кости животного.

Для этого под наркозом внутримышечным введением пропофола из расчета 10 мг/кг проводилось создание искусственного перелома бедренной кости крысы с помощью долота. Остеотомия заключалась в надламывании с помощью долота средней трети бедренной кости, что способствовало созданию поперечной линии перелома. В зону созданного перелома укладывалась альгинатная пленка в качестве интерпоната. Швы накладывались на кожу. Имобилизация не проводилась

Через 4 недели после начала эксперимента 4 крысы были выведены из эксперимента для последующей оценки сформировавшейся модели несросшегося перелома. Подтверждение проводилось рентгенологическим и гистологическим исследованием.

Всех животных, задействованных в данной серии, выводили из опыта путем ингаляционного введения летальной дозы фторотана. Производилось вычленение в смежных суставах препарата фрагментов бедренной кости.

Оставшиеся 26 белых крыс были разделены на две рандомизированные группы по 13 особей в каждой. В первой, контрольной, группе под внутримышечным наркозом пропофолом обнажалась зона ложного сустава. Дрелью со специальной насадкой производилась фиксация отломков бедренной кости 1,0 мм спицей, введенной интрамедуллярно. Кожа ушивалась.

Во второй, опытной, группе производился аналогичный остеосинтез. Дополнительно после фиксации отломков спицей в зону ложного сустава укладывался стерильный композит «ЛитАр». Ориентировочный размер используемого препарата 0,5 на 0,5 см.

В дальнейшем через 1, 2, 4 и 6 недель после проведенного остеосинтеза несросшегося перелома бедренной кости из эксперимента выводились последовательно животные передозировкой ингаляционным наркозом фторотана. При этом через 1, 2 и 4 недели выводились

по 3 белых крысы из каждой группы и в количестве 4 через 6 недель.

На каждом из этапов проводилось рентгенологическое исследование скелета животного. Из полученных препаратов бедренной кости изготавливались гистологические препараты для последующей светооптической оценки динамики репаративного остеогенеза.

Контроль пролиферативной активности в гистологических препаратах групп контроля и опыта оценивался методом иммуногистохимии с использованием моноклональных антител Ki-67.

### Результаты и их обсуждение

Во всех сформированных ложных суставах наблюдался общий анатомический признак – на концах костных отломков несросшихся переломов отмечалось формирование замыкательного костного регенерата из незрелой костной ткани.

В условиях опыта только на первой и второй неделях эксперимента в зоне ложного сустава обнаруживаются включения препарата «ЛитАр», имеющего базофильную окраску. На 4 и 6 неделе эксперимента препарат в зоне ложного сустава не обнаруживается, что свидетельствует о его полной биодеградации к этому сроку эксперимента

К концу первой недели в зоне введения «ЛитАр» и прилежащих участках идет активный ангиогенез и образуется ткань, напоминающая грануляционную с большим количеством новообразованных сосудов, но малым количеством клеток фибробластического дифферона.

К концу первой недели у опытной группы животных на одном из отломков, а к концу 2 недели и на другом обнаруживалась объемная периостально образованная фиброзно-хрящевая мозоль. Появление периостальной мозоли свидетельствует об отсутствии полной обездвижимости отломков или значительном разрушении эндооста [5]. Выявленный активный ангиогенез и достаточность кровообращения в зоне введенного в область ложного сустава препарата «ЛитАр», по нашему мнению, способствует перекрыванию к 4 недели эксперимента фиброзно-хрящевыми мозолями межотломковой щели. Этот морфологический факт

можно рассматривать как проявление приспособительной реакции, направленной на консолидацию кости. Это еще не сращение отломков, лишь фиксация, необходимая для последующего костного сращения. В прилежащих к зоне ложного сустава участках периоста у опытной группы животных к концу 4 недели эксперимента увеличилась относительная объемная плотность сосудов до  $25,3 \pm 2,3$  по сравнению с контролем  $14,2 \pm 1,1$ . У контрольной группы животных в конце 1 и 2 недели так же образовывалась на концах отломков периостально фиброзно-хрящевая мозоль, но перекрывания межотломковой щели не происходило даже на последующих сроках эксперимента.

Во внутреннем слое периоста, покрывающем отломки кости в конце 2 недели в условиях опыта выявлена пролиферация остеогенных клеток, направленная в сторону остатков препарата «ЛитАр». Данный факт подтверждается повышением пролиферативной активности этих клеток, выявляемой иммуногистохимически.

По сравнению с контролем индекс пролиферации этих клеток в зоне прилежащей к зоне ложного сустава в опыте в конце 2 недели почти в 2 раза выше, о чем свидетельствует выявленное повышение экспрессии моноклональных антител Ki-67 в этих клетках при иммуногистохимическом исследовании (Табл. 1).

По сравнению с контролем в конце 2 недели опыта повышается и пролиферация среди эндотелиоцитов и молодых дифференцирующихся из периваскулярных клеток остеобластов. Образующиеся дифференцированные остеобласты, вырабатывая межклеточное вещество, формируют структуры подобные остеогенным

островкам и костные трабекулы, состоящие из грубоволокнистой костной ткани.

Сконцентрированные вокруг мелких кровеносных сосудов камбиальные и эндотелиальные клеточные элементы сосудистых стенок непосредственно участвуют в формировании остеогенной ткани [9], [11]. Течение и завершение репаративной регенерации во многом определяются условиями протекания регенераторного процесса и, прежде всего – трофическим обеспечением, которое в свою очередь зависит от степени кровоснабжения зоны регенерации [8]. Как показали наши исследования в условиях опыта при использовании препарата «ЛитАр» в зоне его введения и вокруг нее повышается пролиферация ангиоцитов, а, следовательно, и ангиогенез. В составе стенки новообразованных сосудов имеются периваскулярные клетки – стволовые клетки для образования клеток остеогенного, хондрогенного, либо фибробластического дифференнов. В районе этих сосудов идет активное образование остеогенных островков и новых костных трабекул, состоящих из грубоволокнистой костной ткани. В периостальной и интермедиальной зонах на концах отломков формируется густая сеть незрелых костных балок, состоящая из грубоволокнистой костной ткани.

В эндостальной зоне в отличие от периостальной и интермедиальной зон регенерации формируются отдельные участки гиалинового хряща. Появление хрящевой ткани в этой зоне на наш взгляд связано с разрушением эндостальной сосудистой сети из-за находящейся здесь спицы. Это подтверждает закономерность протекающих в ходе репаративного остеогенеза процессов: остеохондрогенные клетки дифференцируются либо в остеобласты, либо в хондробласты в зависимости от условий, в которых находятся клетки. Если область хорошо васкуляризирована и богата кислородом, то развивается кость, если сосудов нет – образуется хрящ [4].

В конце 4 недели в условиях опыта новообразованные костные трабекулы подвергаются остеокластической резорбции и ремоделированию, связанных с деятельностью клеток остеокластического дифференна. Наиболее активна в условиях опыта деятельность остео-

Таблица 1. Экспрессия Ki-67 клетками остеогенного слоя надкостницы в конце 2 недели эксперимента (%)

Группы животных	Экспрессия Ki-67 периваскулярными клетками	Экспрессия Ki-67 клетками эндотелия сосудов
Контрольная группа	$11,2 \pm 0,15$	$5,1 \pm 0,30$
Опытная группа	$20,5 \pm 0,24$	$2,2 \pm 0,24$

кластов в эндостальной зоне регенерации, где идет разрушение хрящевой ткани. Обращает на себя внимание обилие кровеносных сосудов, которые образуются в этой зоне.

В условиях контроля к концу 2 недели пролиферативный индекс среди клеток внутреннего остеогенного слоя периоста, расположенного вблизи ложного сустава ниже, чем в опыте и поэтому в периостальной и интермедиальной зонах процесс образования костных трабекул неактивный и наблюдается только на 4 неделе эксперимента. В зоне ложного сустава в конце первой недели преобладала хрящевая ткань.

Хотя в одном из отломков к этому сроку эксперимента была объемная периостально образованная фиброзно-хрящевая мозоль, в интермедиальной и эндостальной зонах регенерации обнаруживалась преимущественно волокнистая и гиалиновая хрящевая ткань. Периостальная зона регенерации на этом сроке исследования представлена единичными трабекулами незрелой грубоволокнистой костной ткани, имеющими участки остеоида. По мере образования костных трабекул в зоне периоста вблизи ложного сустава в конце 4 недели эксперимента, наблюдался активный процесс их разрушения остеокластами. В условиях контроля на этом сроке эксперимента количество остеокластов на условной единице площади выше ( $6,1 \pm 0,4$ ), чем в опыте ( $2,3 \pm 0,13$ ). При этом так активно идут процессы остеокластической резорбции интрамедиальной и эндостальной зон регенерации, что ионы кальция, на наш взгляд, не успевают утилизироваться местно в ходе остеогенеза и накапливаются в соединительной ткани ложного сустава

в виде очагов обызвествления, замедляя тем самым восстановление структуры кости, а образующиеся структуры неполноценны как в морфологическом, так и функциональном отношении.

В интермедиальной зоне трабекулы сформировали сеть с широкими межтрабекулярными промежутками. Как в эндостальной, так и периостальной зоне костные балки еще не ориентированы по направлению силовых линий т.е. параллельно длинной оси кости. К концу эксперимента не происходит восстановление типического строения кости. В контрольной группе животных процессы регенерации в зоне ложного сустава замедлены.

### Выводы

Применение наноразмерного композитного препарата «ЛитАр» для стимуляции остеогенеза в зоне ложного сустава в эксперименте на крысах показало его роль в консолидации переломов.

При этом отмечается активизация репаративного периостального остеогенеза, связанного с выявленным усилением пролиферативной активности остеогенных клеток внутреннего слоя периоста.

В зоне введения препарата и вокруг нее образуются сосуды микроциркуляторного русла с окружающими их остеогенными клетками, способствующими эндостальному остеогенезу.

Так же отмечается формирование периостальной фиброзно-хрящевой мозоли, перекрывающей межотломковую щель.

27.01.2015

### Список литературы:

1. Барабаш А.П. Научно-практический вклад сотрудников СарНИИТО в методику чрескостного остеосинтеза // Саратовский научно-медицинский журнал. 2011. Т. 7, № 2. С.502-505.
2. Бауэр И.В. Организационно-технологические факторы возникновения осложнений при переломах костей и проблемы лечения тяжелых повреждений опорно-двигательного аппарата/ Бауэр И.В., Казарезов М.В., Королева А.М. и др // VII Съезд травматологов-ортопедов России –Новосибирск, 2002 - С 26-27.
3. Берченко Г.Н. Синтетические кальций-фосфатные материалы в травматологии и ортопедии/ Г.Н. Берченко// Сб. работ Всероссийской научно-практической конференции. Применение искусственных кальциево-фосфатных биоматериалов в травматологии и ортопедии. - Москва, 2010. - С.3-5.
4. Гололобов В.Г. Посттравматическая регенерация. В кн:Руководство по гистологии. –Т.1.- СПб.: СпецЛит.- 2001.- С.328-334.
5. Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. -М.:Медицина, 1996. - 208с.
6. Литвинов С.Д. Перспективы применения материала «ЛитАр» для восстановления хрящевой перегородки носа у детей/ Литвинов С.Д., Серегин А.С., Пуштова Т.Б., Олейникова М.М. // [Российская оториноларингология](#). 2006. № 3. С. 66-70.
7. Литвинов С.Д. Наноразмерный композитный материал «ЛитАр»-универсальный имплантат. Самара, 2008. - 250 с.
8. Оноприенко Г.А. Клинические аспекты микроциркуляции и регенерации костной ткани// Актуальные проблемы медицины.- 1993.- С.41-44

9. Hernigou P., Beau jean F. Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning // Rev. Chir. Orthop.- 1997.- Vol.83, №1. P.33-40.
10. Peterson B., Whang P.G., Iglesias R., Wang J.C., Lieberman J.R. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model // J. Bone Joint Surg. Am. – 2004. – V.86. - №10. – P. 2243-2250.
11. Roach J.W., Shindell R., Green N.E. Late-onset pseudarthrosis of the dysplastic tibia // J. Bone Jt Surg. (Am.).- 1993,- Vol.75, №11.- P.1593-1601.
12. Tay W.H., de Steiger R., Richardson M., Gruen R., Balogh Z.J. Health outcomes of delayed union and nonunion of femoral and tibial shaft fractures // Injury. – 2014. – V.45. - №10. – P. 1653-1658.

Сведения об авторах:

**Шилин Владимир Александрович**, врач травматолог-ортопед ГБУЗ «ГКБ №4» г. Оренбурга

**Сафронов Андрей Александрович**, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии  
Оренбургского государственного медицинского университета Минздрава России,  
профессор, доктор медицинских наук

**Кожанова Татьяна Геннадьевна**, доцент кафедры патологической анатомии  
Оренбургского государственного медицинского университета Минздрава России,  
кандидат медицинских наук

460006, г. Оренбург, ул. Советская, 6, e-mail: orgma@esoo.ru