

УДК [612.086:616.718.16-001.513-003.93]-092.9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И СТИМУЛЯЦИЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ВНУТРИСУСТАВНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ У КРЫС

Силантьева Т.А., Краснов В.В., Кубрак Н.В.

*ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган,
e-mail: tamara.silanteva@rncvto.ru*

Разработан способ получения линейного сквозного костно-хрящевого повреждения вертлужной впадины у мелких лабораторных животных (крысы) с возможностью дозированного введения биологически активных веществ в зону повреждения (патент РФ № 2470378). На предложенной экспериментальной модели изучены механизмы остеиндуцирующего влияния композиции гомологичной плазмы крови, растворов аскорбиновой кислоты и глюкозы при их совместном внутрисуставном введении в раннем посттравматическом периоде (патент РФ № 2463986). Установлено, что выполнение ежедневных однократных инъекций указанной композиции ускоряет завершение воспалительной стадии репаративного процесса и заполнение диастаза васкуляризированной грануляционной тканью. Экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в стромальных механоцитах костного мозга, периостальных остеобластах, периваскулоцитах интермедиарной зоны сращения свидетельствует об активизации репаративного остеогенеза.

Ключевые слова: экспериментальная модель, вертлужная впадина, внутрисуставное повреждение, плазма крови, репаративный остеогенез

EXPERIMENTAL MODELING AND STIMULATION OF INTRA-ARTICULAR INJURY HEALING IN RATS

Silanteva T.A., Krasnov V.V., Kubrak N.V.

FSBI RISC «RTO» of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: tamara.silanteva@rncvto.ru

A technique for producing an acetabular linear perforating osteochondral injury in small laboratory animals (rats) developed with the possibility of graduated injections of biologically active agents into the zone of injury (RF Patent No 2470378). The mechanisms of osteoinduction influencing the composition of homologous blood plasma, ascorbic acid and glucose solutions for their combined intraarticular injections in the early posttraumatic period studied using the proposed experimental model (RF Patent No 2463986). Daily single injections of the mentioned composition established to accelerate the completion of the inflammatory stage of reparative process and filling the diastasis with vascularized granulation tissue. Ki-67 proliferation marker expression in bone marrow stromal mechanocytes, periosteal osteoblasts, perivascuocytes of the intermediary zone of union evidences of reparative osteogenesis activation.

Keywords: experimental model, acetabulum, intraarticular injury, blood plasma, reparative osteogenesis

Несмотря на внедрение новых хирургических технологий лечения пациентов с повреждениями крупных суставов, число неблагоприятных исходов ежегодно увеличивается, что указывает на необходимость поиска новых подходов и парадигм [8]. Установлено, что синовиальная жидкость оказывает ингибирующее влияние на заживление внутрисуставного перелома [5]. Являясь фильтратом плазмы крови, она включает дополнительные компоненты, замедляющие процесс репаративного остеогенеза и характеризуется высоким, по сравнению с плазмой крови, содержанием аскорбиновой кислоты [9, 10]. После травмы концентрации компонентов системы антиоксидантной защиты аскорбата и супероксиддисмутазы (СОД) в синовиальной жидкости значительно снижаются [7]. Излившаяся кровь является дополнительным негативным фактором для заживления перелома, так как разрушение эритроцитов в условиях гипоксии приводит к накоплению избытка ионов железа, что на фоне сниженной активности СОД усугубляет тя-

жесть вторичного посттравматического повреждения тканей [2].

С учетом перечисленных патогенетических факторов, предложен способ нейтрализации и удаления цитотоксических соединений из полости сустава путем капельного дренирования композицией лекарственных веществ, включающей аутологичную плазму крови в сочетании с официальными растворами аскорбиновой кислоты и глюкозы (патент РФ № 2463986). Применение данной методики на собаках позволило добиться формирования костного сращения уже на 14 сутки после моделирования перелома вертлужной впадины, в три раза сократив период консолидации и снизив при этом выраженность дегенеративных изменений в суставном хряще [3, 4]. Однако в данном эксперименте не были изучены ранние сроки заживления перелома, что не позволило судить о механизмах феномена. Для продолжения исследований, по нашему мнению, целесообразна адаптация модели внутрисуставного повреждения для мелких лабораторных животных, что согласуется с концепцией аль-

тернативных подходов в экспериментальной биологии и медицине [1].

Целью настоящей работы являлось тестирование биологической активности композиции на основе плазмы крови, аскорбиновой кислоты и глюкозы при дозированном внутрисуставном введении на модели линейного сквозного костно-хрящевого повреждения вертлужной впадины крыс в раннем посттравматическом периоде.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование проведено на 20 крысах Вистар обоего пола в возрасте 10 месяцев, массой тела от 250 до 350 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Оперативные вмешательства и эвтаназия осуществлялись в соответствии требованиями Минздрава России к работе экспериментально-биологических клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» и были одобрены этическим комитетом ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова».

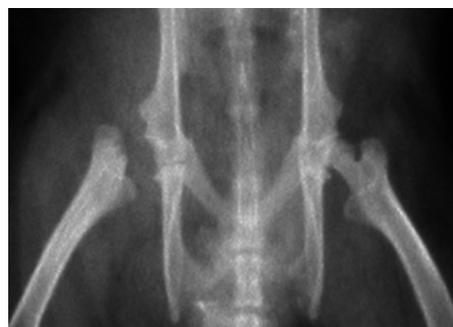
Получение модели линейного сквозного костно-хрящевого повреждения вертлужной впадины (патент РФ № 2470378) выполняли в стерильных условиях под общим комбинированным наркозом: золетил 100 («Virbac Sante Animale», Франция) 8 мг/кг, ксилазин 2% («Alfasan International B.V.», Голландия) 4,0 мг/кг, внутримышечно. В области шейки бедренной кости

вскрывали капсулу сустава и производили вывих головки из вертлужной впадины. Далее с помощью хирургической пилы толщиной 0,2 мм производили поперечный пропил вертлужной впадины со стороны ее дорсальной части до уровня середины суставной ямки, после чего выполняли резекцию головки и шейки бедренной кости [8]. Через операционную рану в суставную полость устанавливали мягкий катетер диаметром 0,6 мм Перификс («В. Braun», Германия) и ушивали капсулу сустава нитью из полипропилена 3/0 (рис. 1, а). Операцию завершали выполнением контрольной рентгенографии (рис. 1, б).

Со 2 по 5 сутки после операции в полость сустава ежедневно, однократно вводили 0,2 мл растворов лекарственных веществ (рис. 1, в). Животным контрольной группы (n = 10) инъецировали 0,9% раствор натрия хлорида. В опытной группе (n = 10) выполняли инъекции композиции, состоящей из гомологичной плазмы крови, официальных растворов 5% аскорбиновой кислоты и 40% глюкозы, взятых в объемном соотношении 7:2:1 (патент РФ № 2463986). Кровь для получения плазмы забирали у интактных животных, используя вакуумные системы с гепарином. Плазму отделяли центрифугированием в лабораторной центрифуге «ОПн-3М» («Дастан», Кыргызстан) при 1000 об/мин в течение 10 мин. Аликвоты плазмы крови объемом 1 мл помещали в пластиковые пробирки с крышками типа Eppendorf и замораживали при –20 °С. Перед выполнением инъекций плазму размораживали при 37 °С. Для стерилизации растворов использовали бактериальный фильтр Перификс 0,2 м («В. Braun», Германия).



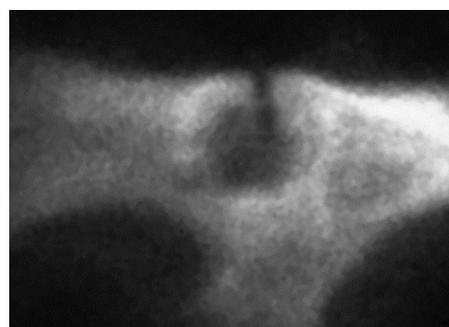
а



б



в



г

Рис. 1. Моделирование повреждения вертлужной впадины крысы: вид операционной раны (а); рентгенограмма пояса тазовых конечностей после операции, дорсо-вентральная проекция (б); внутрисуставное введение композиции лекарственных веществ через коннектор (в); рентгенограмма макропрепарата оперированной вертлужной впадины, латеральная проекция (г)

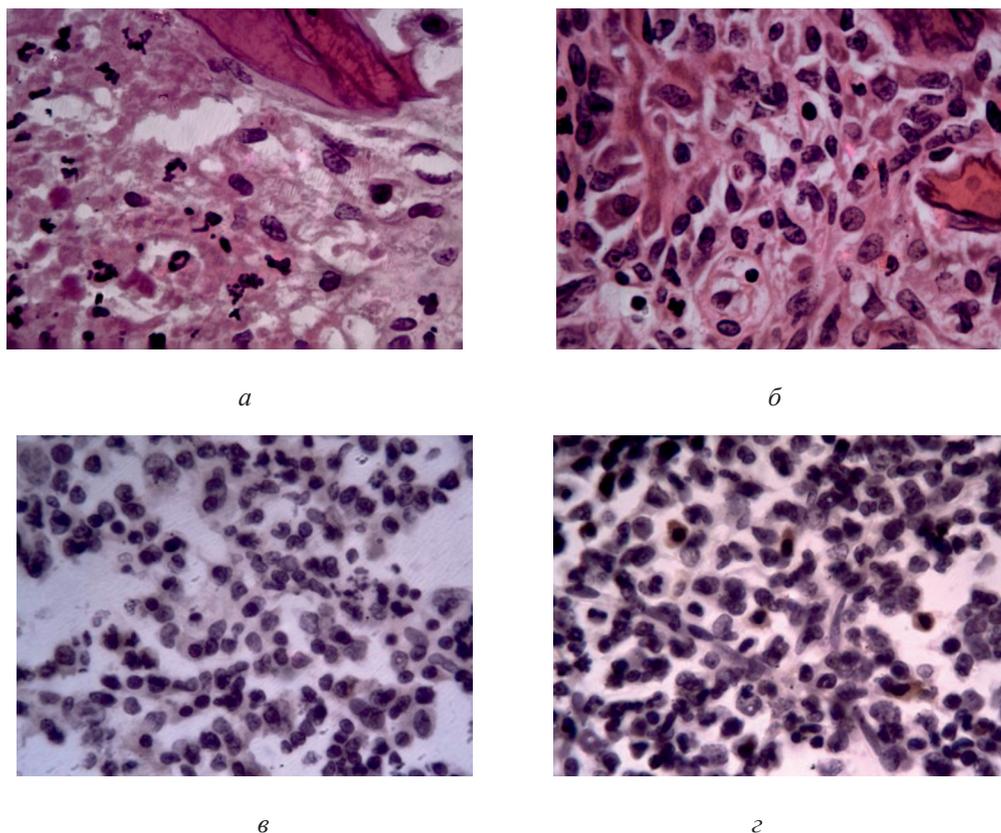


Рис. 2. Влияние остеоиндуцирующей композиции на гистоструктуру вертлужной впадины крыс в области моделирования повреждения: заполнение диастаза между раневыми поверхностями кости детритом с лейкоцитарной инфильтрацией в контроле (а) и грануляционной тканью – в опыте (б); Ki-67-негативное окрашивание костного мозга в контроле (в) и выявление Ki-67-позитивных стромальных механоцитов (указаны стрелками) в костном мозге животных опытной группы (г). Срок эксперимента – 5 суток. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$ (а, б). Иммуногистохимическое определение экспрессии Ki-67 (коричневое окрашивание) с докраской гематоксилином, $\times 400$ (в, г)

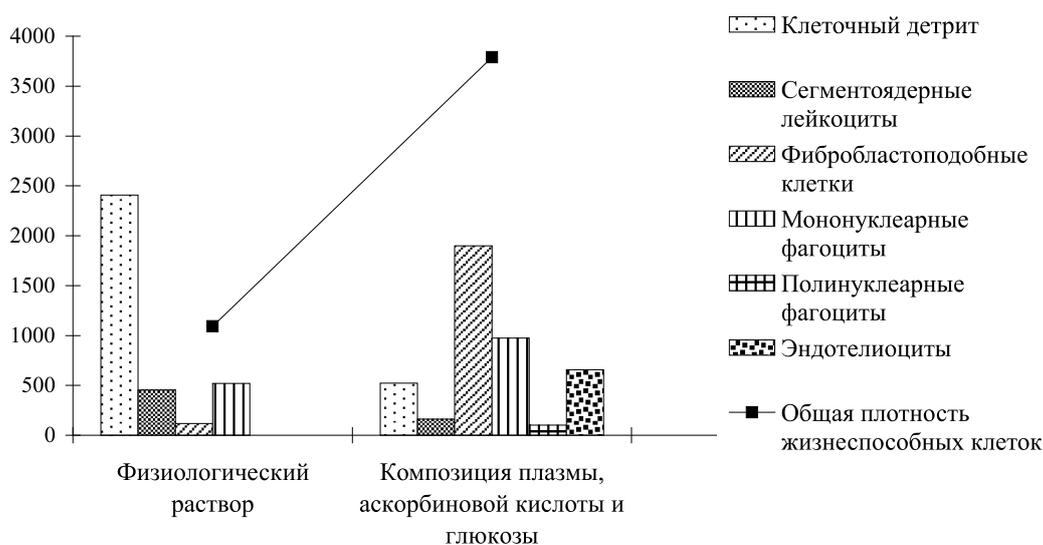


Рис. 3. Влияние остеоиндуцирующей композиции на клеточный состав зоны внутрисуставного повреждения вертлужной впадины крыс через 5 суток эксперимента

По истечении 5 суток после операции, животных эвтаназировали передозировкой тиопентала натрия («Синтез», Россия,) 45 мг/кг, внутривенно. Поврежденную суставную впадину вычленили и выполняли контрольную рентгенографию (рис. 1, г).

Полученный костный блок освобождали от парасальных тканей и помещали на 3 суток в смесь 2% растворов глутарового и параформальдегидов на фосфатном буфере (рН 7,4). Затем образцы обезжировали в ацетоне, декальцинировали в 10% растворе Трилона Б (рН 7,4) и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Экспрессию маркера пролиферативной активности клеток Ki-67 определяли с использованием набора реактивов для иммуногистохимии и системы визуализации RE7140-K («Novocastra», Великобритания).

Исследование гистологических препаратов производили с использованием стереомикроскопа AxioScore.A1 и цифровой камеры AxioCam ICc 5 в комплекте с программным обеспечением Zen blue («Carl Zeiss MicroImaging GmbH», Германия). При микропировании с объективом 100× для масляной иммерсии оценивали клеточную плотность в 1 мм² площади среза для категорий «клеточный детрит» «общая клеточная плотность», «фибробластоподобные клетки», «сегментоядерные лейкоциты», «моноклеарные фагоциты», «полинуклеарные фагоциты», «эндотелиоциты». Измерения выполняли в 10 полях зрения для каждого экспериментального случая, при этом подсчитывали не менее 300 клеток. Значения митотического индекса фибробластоподобных клеток выражали в промилле (‰). Для статистического анализа данных использована программа AtteStat, версия 13.1 (свидетельство № 2002611109). Результаты приведены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Межгрупповые отличия оценивали с применением непарного t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании зоны перелома вертлужной впадины у животных контрольной группы было установлено, что диастаз между отломками был заполнен фибрином и тканевым детритом, включающим поля некротически измененных клеток с выраженным криопикнозом, кариорексисом либо кариолизисом. В клеточном составе преобладали сегментоядерные лейкоциты и моноклеарные фагоциты, характерные для воспалительной стадии репаративного процесса, а также встречались немногочисленные лимфоциты (рис. 2, а).

О начале пролиферативной стадии репарации свидетельствовало присутствие фибробластоподобных веретенновидных клеток с крупным базофильным ядром, содержащим 1–2 ядрышка. Индекс их митотической активности был чрезвычайно высоким, составляя 26,8‰. В костном веществе вертлужной впадины на протяжении 0,5–2 мм от линии повреждения наблюдали пустые костные лакуны и безъядерные

остеоциты, лейкоцитарную инфильтрацию костного мозга (рис. 2, в).

У животных опытной группы диастаз заполняла грануляционная ткань с большим количеством тонкостенных капилляров, выстланных изнутри уплощенными ядросодержащими клетками – эндотелиоцитами. В ее составе преобладали веретенновидные или слабоотросчатые фибробласты, отличающиеся эксцентрично расположенным базофильным эухроматиновым ядром с 1–2 ядрышками и слабо базофильной цитоплазмой. Индекс их митотической активности составлял 2,5‰. Также обнаруживались моноклеарные фагоциты – моноциты и макрофаги. На поверхности травмированных костных трабекул располагались активные остеобласты, встречались немногочисленные остеокласты (рис. 2, б). В костной ткани отломков вблизи линии повреждения определялись ядросодержащие остеоциты, на периостальной и эндостальной поверхности – активные остеобласты.

Иммуногистохимический анализ в контрольной группе показал, что Ki-67-позитивными являлись лишь единичные фибробластоподобные клетки зоны сращения. В опытной группе экспрессия маркера обнаруживалась в отросчатых стромальных механоцитах костного мозга, периостальных остеобластах и периваскулярных клетках грануляционной ткани (рис. 2, в, г). Большая часть метки распределялась в ядре, однако цитоплазма клеток также была слабопозитивной.

Сравнительное морфометрическое исследование клеточного состава зоны сращения отломков выявило статистически значимые межгрупповые отличия по каждому из параметров ($p < 0,001$) (рис. 3).

В контрольной группе численная плотность некротизированных клеток в 1 мм² площади среза составила $2407 \pm 144,4$; общая плотность жизнеспособных ядросодержащих клеток – $1091 \pm 48,8$; фибробластоподобных клеток – $118 \pm 17,0$; сегментоядерных лейкоцитов – $453 \pm 31,1$; моноклеарных фагоцитов – $520 \pm 36,5$; полинуклеарные фагоциты и эндотелиоциты не определялись. В опытной группе соответствующие значения параметров равнялись $521 \pm 18,2$; $3790 \pm 71,7$; $1898 \pm 63,2$; $160 \pm 15,5$; $973 \pm 31,0$; $101 \pm 10,2$; $657 \pm 27,6$. Под влиянием внутрисуставных инъекции тестируемой композиции лекарственных веществ численность некротизированных клеток и сегментоядерных лейкоцитов снижалась в 4,5 и 2,8 раза соответственно. Вме-

сте с тем отмечалось более чем трехкратное увеличение численной плотности жизнеспособных ядродержащих клеток, в том числе фибробластов – в 16 раз и мононуклеарных фагоцитов – в 1,9 раза

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало пригодность разработанной модели сквозного линейного костно-хрящевое повреждение вертлужной впадины мелких лабораторных животных для тестирования биологически активных веществ при их интраартикулярном введении. Полученные результаты позволили раскрыть механизмы, лежащие в основе стимулирующего влияния гомологичной плазмы крови в сочетании с официальными растворами аскорбиновой кислоты и глюкозы. Выполнение ежедневных однократных внутрисуставных инъекций указанной композиции в остром посттравматическом периоде ускоряет завершение воспалительной стадии репаративного процесса и заполнение диастаза васкуляризированной грануляционной тканью. Выявление экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в стромальных механоцитах костного мозга отломков, периостальных остеобластах и периваскулоцитах зоны повреждения свидетельствует об активизации процесса репаративного остеогенеза.

Список литературы

1. Марданова Г.В., Шахламов В.А. Альтернативные подходы в экспериментальной биологии и медицине // Морфология. – 1999. – Т. 116, № 4. – С. 71–79.
2. Орлов Ю.П., Долгих В.Т. Метаболизм железа в биологических системах (биохимические, патофизиологические и клинические аспекты) // Биомед. химия. – 2007. – Т. 53, Вып. 1. – С. 25–38.
3. Силантьева Т.А. Морфологическая характеристика заживления ацетабулярного перелома в условиях чрескостного остеосинтеза и стимуляции интраартикулярным введением препаратов метаболического действия // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 1 (3). – С. 590–594.
4. Силантьева Т.А., Краснов В.В. Стимуляция заживления переломов таза путем локального введения аутологичной плазмы крови в сочетании с метаболически активными веществами антиоксидантного и антигипоксантажного действия // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – № 7–8. – С. 137–143.
5. Abedi G., Alizadeh R., Biabangardi B., Moslemi H. Effect of synovial fluid on intercondylar fracture in cats // Ann. Biol. Res. – 2013. – Vol. 4, № 9. – P. 87–91.
6. Denny H.R., Butterworth S.J. A Guide to Canine and Feline Orthopaedic Surgery. – Wiley-Blackwell, 2000. – 634 p.
7. Flugge L.A., Miller-Deist L.A., Petillo P.A. Towards a molecular understanding of arthritis // Chem. Biol. – 1999. – Vol. 6, № 6. – P. R157–R166.
8. McKinley T.O. Basic Science of Intraarticular Fractures and Posttraumatic Osteoarthritis / T.O. McKinley, J. Borrelli, D.D. D’Lima, B.D. Furman, P.V. Giannoudis // J. Orthop. Trauma. – 2010. – Vol. 24, № 9. – P. 567–570.
9. Stabler T.V., Kraus V.B. Ascorbic acid accumulates in cartilage in vivo // Clin. Chim. Acta. – 2003. – Vol. 334, № 1–2. – P. 157–162.
10. Sun L., Zhou X., Wu B., Tian M. Inhibitory effect of synovial fluid on tendon-to-bone healing: an experimental study in rabbits // Arthroscopy. – 2012. – Vol. 28, № 9. – P. 1297–1305.