

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ КЛЕТОЧНЫХ ДИФФЕРОНОВ И КОЛЛАГЕНОВЫХ БЕЛКОВ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА В ПРОЦЕССЕ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГИСТОГЕНЕЗА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ

Шурыгина Е.И., Куприянова Е.Д.

*Оренбургский государственный медицинский университет,
Кафедра патологической анатомии,
Оренбург*

Ключевые слова: фактор роста фибробластов, остеогистогенез, дифферон.

Резюме. В ходе данного эксперимента выявлено влияние фактора роста фибробластов бактериальной природы на процесс репаративной регенерации костной ткани. Изучены процессы становления гетероморфного дифферона костной ткани, а также динамика экспрессии коллагена I и II типов в экстрацеллюлярном матриксе кости. Доказано, что консолидация перелома при применении фактора роста фибробластов бактериальной природы происходит в более ранние сроки.

Resume. The experiment revealed the effect of growth factor of fibroblasts bacterial origin on the process of reparative regeneration of bone tissue. The processes of formation of heteromorphic differon of bone tissue, as well as dynamics of the expression of collagen type I and II in the extracellular matrix of the bone were studied. It is proved that consolidation of the fracture in the application of growth factor of fibroblasts bacterial origin occurs at an earlier date.

Актуальность. Переломы длинных костей скелета, сопровождающиеся различного рода осложнениями и инвалидизацией пострадавших, – актуальная проблема травматологии и ортопедии. Для восстановления костной ткани в настоящее время используют различные методы, однако, актуальной задачей является разработка новых средств, стимулирующих процессы репарации кости [4]. Нами исследовалось влияние фактора роста фибробластов бактериальной природы (*Bacillus subtilis* 804) на репаративный остеогистогенез. Известно, что приоритетную роль при репарации костной ткани играют процессы моделирования и ремоделирования основного белка экстрацеллюлярного матрикса кости – коллагена [3].

Цель нашего исследования – выявить особенности становления остеобластического дифферона и динамику экспрессии коллагеновых белков в процессе репаративного остеогистогенеза при применении фактора роста фибробластов бактериальной природы (ФРФб).

Задачи исследования: 1. Изучить динамику остеобластического дифферона в зоне перелома на разных сроках остеогистогенеза. 2. Определить уровни экспрессии коллагенов I и II типов в зоне перелома. 3. Выявить сроки консолидации перелома в опытной и контрольной группах, а также сроки резорбции периостальной и эндостальной мозолей.

Материал и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на 70 половозрелых самцах крыс линии «Вистар». Животным под ингаляционным наркозом формировали открытый поперечный перелом диафиза большеберцовой кости. В опытной группе (ОГ) животным в область перелома на 1 и 2 сутки эксперимента вводили по 0,5 мл препарата ФРФб, в контрольной группе (КГ) – 0,5 мл физ. раствора. Животных выводили из опыта на 3, 7, 14, 21, 28 и 61 сутки. Исследования проводили с использованием гистологических (окраска гематоксилином Майера и эозином), иммуногистохимических методов (антитела anti-Collagene I Type и anti-Collagene II Type, «GeneTex», США) и морфометрии (подсчет клеток производился в абсолютных значениях (абсолютная численная плотность - АЧП); подсчет площади коллагеновых волокон производился в относительных значениях (относительная объёмная плотность - ООП).

Результаты исследования. На 3 сутки у животных КГ в интермедиарной зоне перелома выраженная воспалительная реакция: отёк, лейкоцитарная инфильтрация, отсутствие остеокластов. Пролиферирующие клетки надкостницы начинают дифференцироваться в хондробласты (АЧП $101,0 \pm 8,0$ /п.з.), формируя тонкий слой периостальной костной мозоли (ПМ). Признаки формирования эндостальной костной мозоли (ЭМ) отсутствуют. На 3 сутки у животных ОГ в области ИМ воспалительная реакция нивелирована, имеется обилие волокнистого матрикса, появившиеся остеокласты формируют лакуны резорбции в интермедиарной зоне костных отломков. На фоне развитой грануляционной ткани, заметна выраженная пролиферация клеток мезенхимы с началом дифференцировки фибробластоподобных клеток - предшественников в хондробласты и остеобласты. Сформирована ПМ, хрящ которой в центральных отделах состоит преимущественно из хондроцитов (АЧП $31,0 \pm 4$ /п.з.), часть которых в состоянии вакуолярной дистрофии и лизиса (деградация хряща). В периферических отделах ПМ число остеобластов достигает $66,0 \pm 5,0$ /п.з., а остеоцитов – $10,0 \pm 2,0$ /п.з., т.е. преобладают процессы остеогенной дифференцировки фибробластоподобных клеток предшественников. В эндостальной зоне перелома признаки пролиферации клеток эндоста с миграцией в интермедиарную зону. Заметна реакция остеокластов (АЧП $3,0 \pm 1,0$ /п.з.). ЭМ в центральных отделах представлена значительным числом пролиферирующих фибробластоподобных клеток-предшественников (АЧП $411,0 \pm 25,0$ /п.з.) с отсутствием признаков хондро- и остеогенной дифференцировки. Важным отличием гистоархитектоники места перелома в ОГ на 3 сутки является более выраженная реакция фибробластов в зоне перелома, появление в периферических частях хрящевой манжетки участков

остеоидной ткани. На 3 сутки экспрессия коллагена I типа (КI) в ПМ в ОГ (ООП $9,40 \pm 0,62\%$) больше таковой в КГ (ООП $3,92 \pm 0,31\%$) почти в 3 раза. У животных КГ ООП коллагена II типа (КII) составляет $4,77 \pm 0,11\%$, что незначительно превышает данный показатель в ОГ (ООП КII $4,03 \pm 0,08\%$) (см. Рис.1,2). ООП КI в ЭМ в обеих группах втрое, а ООП КII – вчетверо меньше, чем в периостальной мозоли.

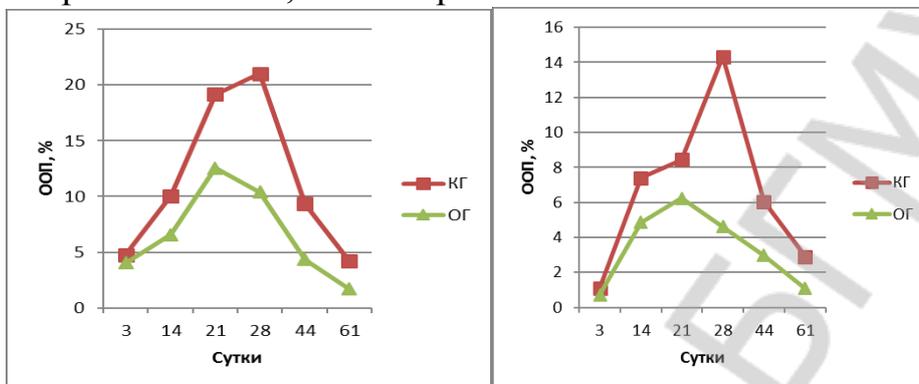


Рис. 1. ООП КII типа в ПМ.

Рис. 2. ООП КII типа в ЭМ.

На 7 сутки в контроле в интермедиарной зоне перелома на фоне развитой грануляционной ткани заметна пролиферация клеток мезенхимы (АЧП $195,0 \pm 13,0/\text{п.з.}$ и небольшие группы остеогенных клеток (АЧП $33,0 \pm 5,0/\text{п.з.}$). Остеокласты единичны (АЧП 1-2/п.з.), резорбция костных отломков не выражена. Хрящ ПМ состоит из хондробластов и хондроцитов (АЧП $165,0 \pm 15,0/\text{п.з.}$). В ЭМ признаки пролиферации клеток эндоста с дифференцировкой преимущественно в остеобласты (АЧП $33,0 \pm 4,0/\text{п.з.}$) и формированием незрелой ретикулофиброзной костной ткани (РФК), частично заполняющей костномозговой канал в области костных отломков. На 7 сутки в ОГ со стороны периостальных зон перелома начинает формироваться интермедиарная мозоль (ИМ), состоящая из хряща, клеточный состав которого представлен небольшим числом хондроцитов (АЧП $25,0 \pm 3,0/\text{п.з.}$). Центральные же отделы ИМ содержат редуцирующуюся грануляционную ткань с обилием волокнистого матрикса и пролиферирующих остеогенных клеток (АЧП $173,0 \pm 17,0/\text{п.з.}$). ПМ деградирует за счёт лизиса хондроцитов и формирования хондрокластами очагов резорбции с замещением хряща на хорошо васкуляризованную волокнистую соединительную ткань с формированием остеогенных островков РФК. ЭМ представлена деградирующим хрящом с формированием костных балок, состоящих из остеобластов и незрелого внеклеточного остеоидного матрикса. Остеокласты (АЧП $5,0 \pm 2,0/\text{п.з.}$) формируют многочисленные лакуны резорбции. На 7 сутки экспрессия КI в ПМ в ОГ (ООП $15,21 \pm 0,23\%$), по сравнению с предыдущим сроком, значительно возрастает и больше таковой в КГ (ООП $9,24 \pm 0,12\%$). В КГ у животных ООП КII $10,04 \pm 0,16\%$, что почти вдвое превышает данный показатель в ОГ (ООП КII $6,58 \pm 0,27\%$). ООП КI эндостальной зоне перелома в КГ –

3,33±0,08%, в ОГ – 6,97±0,13%. ООП КП в КГ – 7,41±0,22%, в ОГ – 4,86±0,39%.

На 14 сутки в контроле в ИМ остеокласты (АЧП 3,0±1,0/п.з.) активно участвуют в резорбции костных отломков. ПМ деградирует за счёт лизиса хондроцитов (АЧП 44,0±5,0/п.з.) и формирования хондрокластами очагов резорбции с замещением хряща на волокнистую соединительную ткань. Небольшие тяжи хряща ПМ проникают в интермедиарную зону, таким образом, образуя хрящевой компонент ИМ. На данном сроке в КГ отмечаем и наибольшую активность хондрокластов (в ОГ она наблюдалась уже на 7 сутки), обеспечивающих резорбцию хряща ПМ. ЭМ представлена деградирующим хрящом и формирующимися костными балками, состоящими преимущественно из остеобластов (АЧП 79,0±6,0/п.з.) и незрелого внеклеточного остеидного матрикса. В ОГ на 14 сутки ИМ представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования РФК, состоящими преимущественно из остеобластов (АЧП 108,0±9,0/п.з.), а также значительного числа остеоцитов (АЧП 91,0±6,0/п.з.). ПМ так же, как и периферические отделы ИМ, состоит из остатков деградирующего хряща и очагов формирующейся РФК. ЭМ представлена сформированными костными балками, состоящими из остеобластов (АЧП 95,0±7,0/п.з.) и уже значительного числа остеоцитов (АЧП 55,0±4,0/п.з.). При этом балки ЭМ активно разрушаются многочисленными остеокластами (АЧП 7,0±2,0/п.з.), за счёт формирования лакун резорбции, т.е. уже на этом сроке инициируется процесс формирования костномозгового канала с появлением единичных гемопозитическими островков клеток красного костного мозга (ККМ) (АЧП 25,0±7,0/п.з.).

На 21 сутки в группе контроля ИМ по-прежнему представлена очагами редуцирующейся грануляционной ткани с группами пролиферирующих клеток преимущественно фибробластического дифферона (АЧП 27,0±4,0/п.з.). ПМ так же, как и периферические отделы ИМ, представлена остатками деградирующего хряща (АЧП хондробластов и хондроцитов 65,0±7,0/п.з.) и очагами формирования РФК (АЧП остеобластов и остеоцитов 140,0±11,0/п.з.). ЭМ формируют костные балки, состоящие преимущественно из остеобластов (АЧП 83,0±7,0/п.з.) и небольшого числа остеоцитов (АЧП 9,0±2,0/п.з.). На этом инициируется процесс формирования костномозгового канала с появлением немногочисленных гемопозитическими островков клеток ККМ (АЧП 47,0±9,0/п.з.). На 21 сутки у животных ОГ вся площадь ИМ представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования РФК, состоящими преимущественно из остеобластов (АЧП 155,0±12,0/п.з.). ПМ представлена полями РФК и лишь небольшими очагами деградирующего хряща (АЧП хондроцитов 4,0±1,0/п.з.). ЭМ представлена узкой полоской сформированной костными балками РФК на границе с ИМ. При этом новообразованные балки ЭМ активно разрушаются остеокластами (АЧП 5,0±2,0/п.з.), за счёт формирования лакун резорбции, т.е. прогрессирует процесс формирования костномозгового канала с появлением уже

многочисленных гемопоэтическими островков клеток ККМ (АЧП $147,0 \pm 18,0/\text{п.з.}$). На 21 сутки в ПМ экспрессия КІ в ОГ (ООП $20,7 \pm 1,01\%$) возрастает и больше таковой КГ (ООП $11,25 \pm 1,12\%$). В КГ у животных ООП КІ составляет $19,16 \pm 0,98\%$, в ОГ – $12,55 \pm 0,52\%$, т.е. происходит двукратное увеличение экспрессии коллагена II по сравнению с предыдущим сроком. ООП КІ ЭМ в КГ – $8,47 \pm 0,89\%$, в ОГ – $19,24 \pm 1,72\%$. ООП КІІ в КГ – $8,44 \pm 0,36\%$, в ОГ – $6,25 \pm 0,32\%$.

Экспрессия КІ в ПМ в ОГ (ООП $29,85 \pm 1,03\%$) на 28 сутки возрастает и, по-прежнему, больше таковой КГ (ООП $16,23 \pm 1,08\%$). В КГ у животных ООП КІІ – $21,01 \pm 1,12\%$, в ОГ – $10,38 \pm 1,02\%$ (Рис.3). Таким образом, в ОГ (в отличие от КГ) происходит уменьшение экспрессии КІІ по сравнению с предыдущим сроком, что связано с хондроллизом хряща и остеогенной реорганизацией ПМ. ООП КІ в ЭМ в КГ продолжает увеличиваться – $10,52 \pm 0,07\%$, тогда как в ОГ двукратно уменьшается – $12,09 \pm 0,22\%$. ООП КІІ в КГ – $14,32 \pm 0,72\%$, в ОГ – $4,61 \pm 0,41\%$ (Рис.4).



Рис. 3. ООП коллагена II типа в ПМ в ОГ на 21 сутки.

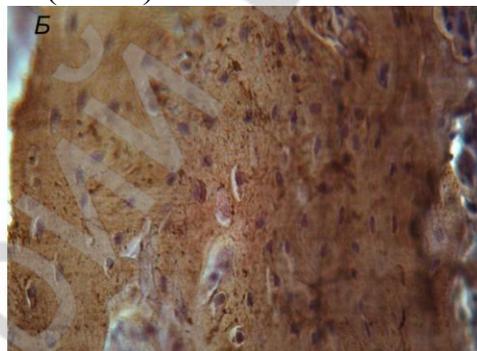


Рис. 4. ООП коллагена II типа в ЭМ мозоли в ОГ на 21 сутки.

На 61 сутки в КГ ИМ представлена разросшейся РФК, местами с ещё сохраненными мелкими очагами деградирующего гиалинового хряща (АЧП хондроцитов $14,0 \pm 3,0/\text{п.з.}$) и немногочисленными костномозговыми полостями без признаков формирования костномозгового канала. ЭМ представлена немногочисленными, но широкими костными балками РФК преимущественно на границе с интермедиарной зоной и у эндоста. На месте редуцирующейся ЭМ формируется костномозговой канал с АЧП $251,0 \pm 19,0/\text{п.з.}$ клеток ККМ. На 61 сутки у животных ОГ наблюдается полная консолидация перелома с полноценной перестройкой костной мозоли в диафиз трубчатой кости с органотипичным строением периоста, эндоста, а также преимущественно пластинчатого строения кости с разделением на компактное и губчатое вещество. В ПМ на 61 сутки экспрессия КІ в ОГ (ООП $69,25 \pm 2,23\%$) возрастает более чем на треть и на треть больше, чем в КГ (ООП $46,09 \pm 1,74\%$), на данном сроке достигая значений близких с ООП КІ нормальной (около $70,0\%$) костной ткани. В КГ у животных ООП КІІ – $4,19 \pm 0,13\%$, в ОГ – $1,68 \pm 0,09\%$. ООП КІ ЭМ в КГ начинает уменьшаться только на данном сроке – $8,87 \pm 0,05\%$, подтверждая только начавшийся процесс редукции ЭМ, тогда как в ОГ ООП КІ составляет $8,01 \pm 0,02\%$,

достигая значений близких с ООП КІ нормальной костной ткани (около 7,0-8,0%). ООП КІІ в КГ – $2,9 \pm 0,03\%$, в ОГ – $1,09 \pm 0,02\%$.

Выводы: 1. В обеих сравниваемых группах сращение отломков кости проходит хрящевую стадию, но в ОГ, наряду с формированием более массивной хрящевой манжетки уже к 3-м суткам, наблюдаем и раннюю резорбцию хряща (14 сутки). 2. Благодаря своевременной и надежной фиксации отломков ПМ в ОГ ИМ начинает формироваться на 7 сутки (в КГ – на 14 сутки), а образование костномозгового канала в ОГ отмечаем с 14 суток (в КГ – с 21 суток). 3. В ОГ уже на 3 сутки наблюдается значительная активация неоангиогенеза (АЧП эндотелиоцитов $42,0 \pm 6,0/\text{п.з.}$, а КГ – $7 \pm 2,0/\text{п.з.}$), что обеспечивает не только более ранние сроки образования костной мозоли, но и преобладание остеобластического типа дивергентной дифференцировки [5]. 4. В ОГ показатели синтеза КІІ на всех сроках эксперимента значительно ниже таковых по сравнению с КГ. 5. ООП КІІ при сопоставимых сроках в эндостальной мозоли всегда меньше таковой, чем в периостальной мозоли, что объясняется лучшей васкуляризацией первой. 6. Уменьшение в ЭМ КІ и КІІ в ОГ на 28, а в КГ только на 61 сутки эксперимента объясняется её ранней редукцией в ОГ.

Таким образом, консолидация перелома при применении ФРФб происходит в более ранние сроки, что обусловлено его мощным ангиогенным воздействием, а также влиянием на пролиферативную активность остеогенных элементов.

Литература

1. Аблаев Н.Р. Остеокальцин – новый гормон костной ткани// Медицина. – 2013. - №3. – С.12-14
2. Алексеев А.А., Бобровников А.Э. Местное применение стимуляторов регенерации для лечения ран // Комбустиология. – 2010. – вып.41. – С.5-15.
3. Иванов С.Б. Разработка биоматериалов для остеопластики на основе коллагена костной ткани/ Иванов С.Б., Ларионов Е.В., Панин А.М. // Клиническая стоматология. – 2005. - №4. – С.1-4
4. Марков Д.А. Стимуляция репаративного гистогенеза при лечении диафизарных переломов длинных костей // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Саратов, 2008. – 23 с.
5. Омеляненко Н.П. Современные возможности оптимизации репаративной регенерации костной ткани / Н.П. Омеляненко, С.П. Миронов, Ю.И. Денисов-Никольский и др. // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2002. – №4. – С. 85-88.
6. Kanczler J.M., Oreffo R.O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone // Eur. Cell Mater. – 2008. – Vol. 15. – P. 100-114.
7. Ornitz D.M. Fibroblast growth factors // Genon Biology. – 2001. – № 2. – P. 3005.1-3005.12.