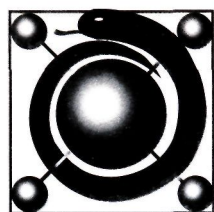


# ТАВРИЧЕСКИЙ МЕДИКО- БИОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

**TAVRICHESKIY MEDIKO-BIOLOGICHESKIY VESTNIK**



Том 11

Volume 11

2008

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 3

УДК 611.018-616-001.5

© М.В. Погорелов, В.І. Бумейстер, 2009

## МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ОЦІНКА РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ

М.В. Погорелов, В.І. Бумейстер

*Кафедра анатомії людини (зав. - проф. Сікора В.З.) медичного інституту СумДУ*

### MORPHOFUNCTIAL APPRECIATION OF THE BONE REPAIR PROCESSES

M.V. Pogorelov, V.I. Bumeyster

#### SUMMARY

In article has been studies reaction of the bone tissue after the trauma by methods of osteometries, hystomorphometric, scan microscopy, biochemics and spectroscopy in different term of repair osteogenesis. The dates that we found say about complex reaction of the whole organism for the trauma, wich activise mechanism of bone repair.

### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

М.В. Погорелов, В.И. Бумейстер

#### РЕЗЮМЕ

В работе проведено комплексное изучение изменений в костной ткани после нанесения дефекта методами остеометрии, гистоморфометрии, растровой электронной микроскопии, биохимии и спектрофотометрии в основные стадии репаративного остеогенеза. Полученные данные свидетельствуют о выраженной комплексной реакции всего организма на травму, что приводит к активации механизмов репарации костной ткани.

Ключові слова: репаративний остеогенез, морфологія, скануюча мікроскопія, біохімія, спектральний аналіз.

Здатність відновлювання цілісності організму після травми або втрати тканини є фундаментальною властивістю живих істот. Тому регенерація як загальнобіологічне явище привертає увагу дослідників. Репаративна регенерація, яка виникає як відповідь на пошкодження тканин та органів, як правило, тісно взаємопов'язана з іншими еволюційно виробленими реакціями на пошкодження - запаленням та склерозом (фіброзом). В процесі репаративної регенерації яскраво проявляється єдність запалення, регенерації і фіброза, які по суті є нерозривними компонентами цілісної тканинної реакції на пошкодження. Ця реакція відбувається за допомогою саморегулюючої системи зі стереотипною динамікою яка принципіально не залежить від типу пошкоджуючого фактора (механічна чи термічна травма, екзо- і ендотоксини, циркуляторні порушення), даний чинник і визначає деяку своєрідність реакції. Посттравматична регенерація є складним процесом, в якому приймає участь нервова, гуморальна, ендокринна та інші системи організму, відповідні за відновлення і підтримку нормальної структури і функції органів та тканин

організму. Розуміння змін, які відбуваються внаслідок травми на всіх рівнях організму дасть змогу регулювати репаративні процеси та запобігати розвитку диерегенерації.

Тому метою нашої роботи було вивчення реакції кісткової системи та організму в цілому на механічне ушкодження кістки в різні терміни репаративного процесу.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В експерименті було задіяно 48 білих щурів самців 4-х місячного віку. Під інгальційним наркотановим наркозом наносився дірчастий дефект в середній третині великогомілкової кістки за допомогою стоматологічного бору діаметром 2 мм. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом в терміни 5, 10, 15 та 24 доби після нанесення дефекту та вилучали травмовані кістки. Прерод декапітацією у тварин збиралась кров з хвостової вени для проведення біохімічного аналізу. У всіх тварини проводилась остеометрія кісток, вивчення морфології регенерату за допомогою світлової та растрової

електронної мікроскопії, морфометрії регенерату, визначення хімічного складу місця травми методами полум'яневої спектрофотометрії та зондового мікроаналізу, біохімічне дослідження крові.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В умовах проведеного експерименту при дірчастому дефекті великогомілкової кістки в ділянці середини діяфізу відбувається порушення її цілісності, що призводить до розриву окістя, перелому кісткових пластинок, розриву ендосту, судин і нервів, які проходять в остеонах, кістковому мозку, травми тканин кісткового мозку. Меншого ступеню пошкодження зазнають м'язова та сполучна тканини зі своїм судинним та нервовим апаратом, які оточують кістку.

На 5 добу досить чітко проявляється межа між деструктивно зміненою частиною дефекту та материнською кісткою. У ділянці дефекту переважає молода грануляційна тканина з великою кількістю тонкостінних капілярів різного діаметру та високою щільністю клітин, таких як макрофаги, лімфоцити, фібробласти, плазмоцити, та малодиференційовані сполучнотканинні клітини. Клітини знаходяться на стадії активного фагоцитозу, переповнені тканинним детритом. Серед клітин спостерігалися гинучі макрофаги, ліпофаги, секреторний фенотип макрофагів. У центрі дефекту розташовуються незначні за розмірами ділянки, що містять тяжі фібрину, численні еритроцити та зруйновані лейкоцити, які є залишками посттравматичної гематоми. В ділянці дефекту формуються капіляри, в основному синусоїдного типу, в ендотелії яких зустрічаються клітини, що діляться мітозом. Навколо них розташовуються периваскулярна клітини та клітини фібробластичного ряду з інтенсивною базофільною цитоплазмою, які мають тісні зв'язки зі стінкою новоутворених кровеносних судин. Периваскулоцити не формують суцільний шар зовні від ендотелію і, як правило, відділені від останнього базальною пластинкою. На межі з материнською

кістковою тканиною спостерігається шар фіброретикулярної тканини, яка складається з пучків колагенових волокон різної товщини, між якими розташовуються крупні фібробласти витягнутої форми з великими ядрами, в яких виявляються 1-3 ядерця. В материнській кістці біля ділянки ушкодження спостерігаються поодинокі порожні остеоцитарні лакуни, що є результатом порушення кровопостачання ділянки кістки внаслідок пошкодження судин. В періості неушкоджених ділянок кістки, в першу чергу в його остеогенному шарі, виявляються реактивні зміни преостеобластів та остеобластів, посилюється базофілія їх цитоплазми, чітко помітні крупні ядерця, відмічаються мітози камбіальних елементів окістя, що характерно для проліферативної фази регенерації.

Гістоморфометрія препаратів травмованих кісток в даний термін спостереження виявляє неоднорідність клітинного складу регенерату (Рис 1). Серед клітин переважали фібробласти (27,6%±2,3) та лімфоцити (23,6%±1,32), кількість плазмоцитів та нейтрофілів, що приймають участь у кооперації та диференційованні клітин становить відповідно 14,0±0,96% та 7,6±0,27%. Відсоток макрофагів та малодиференційованих сполучнотканинних клітин в даний термін становить 13,2±0,83% та 14,0±1,53%.

Таким чином, в термін 5 днів після нанесення дефекту основною складовою гістологічного процесу є морфофункціональні прояви лейкоцитарного-фібробластичного та макрофагального диферонів, їх внутрішньодиферонна гетероморфія та нові міжклітинні взаємодії, що призвели до очищення зони ушкодження від клітин та міжклітинних структур. Все це разом з початком ангиогенезу та міграцією фібробластів в зону пошкодження передують розгортванню регенераційного гістогенезу.

Рівень білка плазми на 5-ту добу після перелому складає 6,98г%, лужної фосфатази - 4732,69±58,4 нмоль/с\*л та кальцію - 2,58±0,04 нмоль/л. Активність

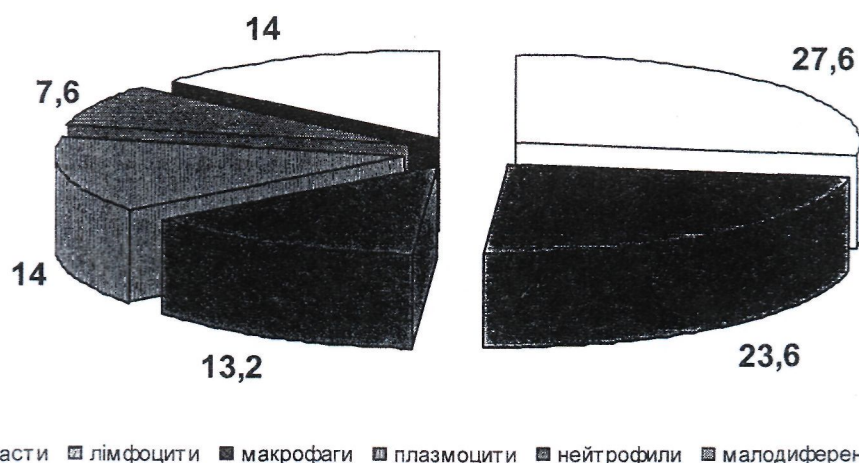


Рис. 1. Процентне співвідношення клітинного складу регенерату великогомілкової кістки щура через 5 днів після нанесення дефекту.



трансаміназ незначно та недостовірно знижується.

Вивчення хімічного складу ділянки дефекту методом спектрального аналізу показало зниження вмісту Са до 25,41 %, що є наслідком втрати основного елемента кістки після нанесення дефекту. Рівень міді, цинку та марганцю в даний термін спостереження залишається в межах норми. Натомість різко зростає концентрація заліза та магнію відповідно до 2,7 мг %/золу та 1,52мг%/золу. Таке значне збільшення даних макроелементів є наслідком формування посттравматичної гематоми та міграції клітин крові та кісткового мозку в ділянку дефекту.

Остеометрія досліджуваних кісток не показала різниці з неушкодженою кісткою повздовжніх та поперечних розмірів.

Методом растрової електронної мікроскопії при низькому збільшенні візуалізується округлої форми дефект з гомогенним вмістом (Рис. 2). Методом зондового аналізу поверхні дефекту звертає на себе увагу відсутність остеотропних елементів - кальцію та фосфору, що характеризує відсутність кальцифікації місця травми в даний термін. Біля зони дефекту та на відстані від перелому вміст кальцію та фосфору дорівнює відповідно 21,055 в%, 9,352 в% та 2,25.

Через 10 діб після моделювання дефекту у тварин контрольної групи основну територію дефекту займає зріла фіброретикулярна тканина остеогенного характеру з високою щільністю клітин ( $35,28 \pm 2,95\%$ ) та ділянками грануляційної тканини ( $30,14 \pm 1,97\%$ ). Характерним для неї є велика кількість фіброblastів, макрофагів, капілярів, а також міжклітинна речовина, що формується. В регенераті ведучим дифероном є фіброblastичний, елементи якого відрізняються різним ступенем диференціювання. Для даного терміну характерним є формування грубоволокни-

тої кісткової тканини, що формує нерівномірну сітку кісткових трабекул біля межі з материнською кісткою, об'єм її становить  $34,58 \pm 3,05\%$  (Рис. 3). Характерною ознакою її в цей термін є неоднорідне забарвлення, що свідчить про різну ступінь кальцифікації та велика кількість секретуючих остеобластів на поверхні трабекул. В останніх виявляється крупні світлі ядра з чіткими ядерцями, ядра деяких клітин займають ексцентричне положення в цитоплазмі. На поверхні таких остеобластів, а також між ними, помітні перші порції міжклітинної речовини, до продукції якої приступили ці клітини. В сполучнотканинному регенераті в добре васкуляризованих ділянках виникають локальні островці остеогістогенезу (рис. 3). Джерелом утворення остеогенних елементів в таких вогнищах є індуцибельні до остеогістогенезу периваскулярні клітини, які під впливом факторів локального мікрооточення і факторів росту диференціюються в елементи остеобластичного диферону. У материнській кістці відмічаються явища перебудови - кортикальна пластинка біля зони ушкодження з пустими лакунами остецитів. На ділянках кортексу, що прилягає до регенерату, виявляються остеокласта, які формують на його поверхні резорбційні лакуни. Материнська губчаста тканина біля зони дефекту також без остецитів, з широкими базофільними лініями склеювання. По поверхні трабекул спостерігаються нашарування остеоїду з крупними остеобластами у вигляді «частоколу».

Через 10 діб після нанесення дефекту вміст білка крові різко знижується у порівнянні з попереднім терміном та становить  $5,29 \pm 0,04$  г%. Таке зменшення можна пояснити стрімким зростанням потреби в протеїнах для формування матриксу в місці травми та перевагою анаболічних процесів в організмі. В

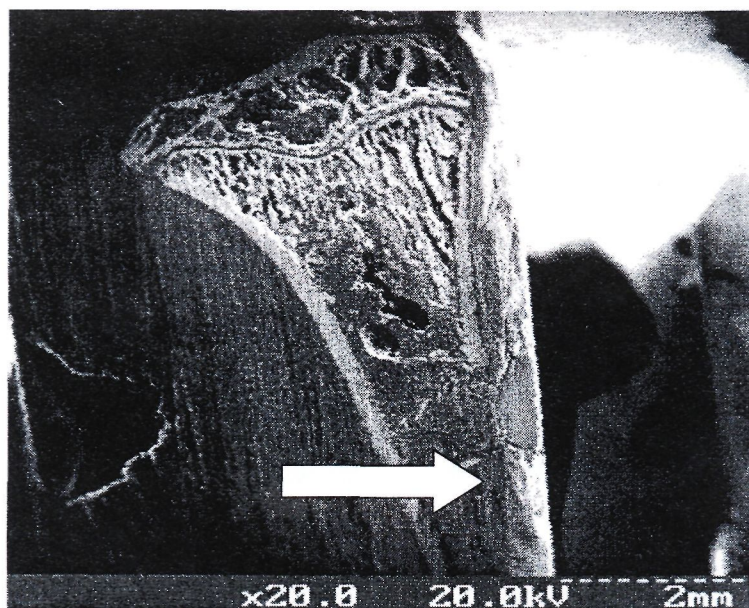


Рис. 2. Сканограмма поверхні травмованої кістки через 5 діб після нанесення дефекту. Zoom 20. Стрілкою вказано місце дефекту, заповнене гомогенним вмістом.

порівнянні з попереднім терміном знижується рівень лужної фосфатази, що дорівнює 3116,91 нмоль/с\*л і є наслідком зменшення ділянки ушкодження і початком формування кісткового матриксу. Разом з тим вміст кальцію перевищує данні попереднього терміну та становить 4,19 ммоль/л, що можна пояснити початком процесів кальцифікації матриксу регенерату та втратою даного елемента материнською кісткою.

Хімічний склад ділянки дефекту дещо відрізняється від попереднього терміну спостереження. Вміст міді, кальцію та марганцю залишається на такому ж

рівні. Відбувається зниження рівню заліза майже у 2 рази, що свідчить про регресію гематоми та зменшення кількості клітин крові та червоного кісткового мозку в зоні перелому. Натомість різко зростає рівень цинку (до 0,662 мг %/золу) та магнію (до 2,65 мг %/золу), що можливо пов'язано з участю даних елементів в активації ферментів, які приймають участь в остеогенезі та відновленні ушкодженої кістки.

Сканограми, що отримані з травмованих кісток, показують наявність в дефекті трабекул, що формуються (Рис. 4). Але в зоні регенерату вміст кальцію та фосфору дуже низький, що вказує на низьку мінера-

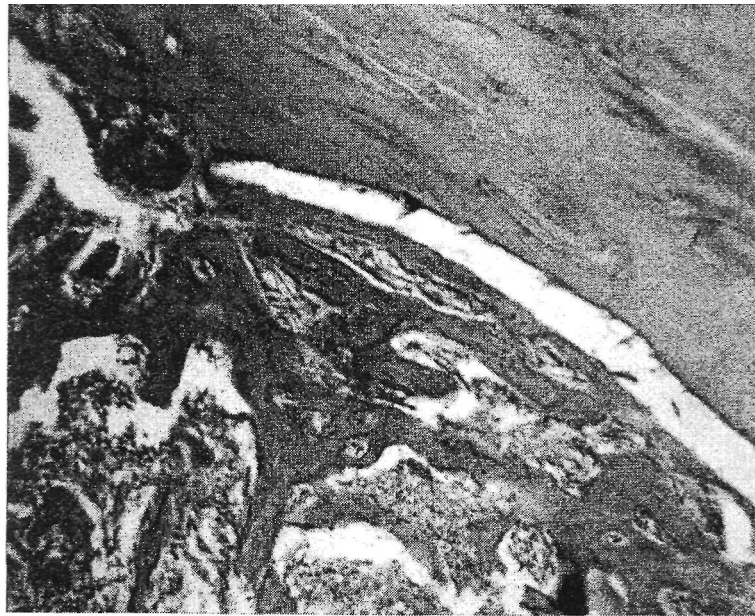


Рис. 3. Ділянка дефекту великогомілкової кістки через 10 днів після нанесення дефекту. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoom X 400

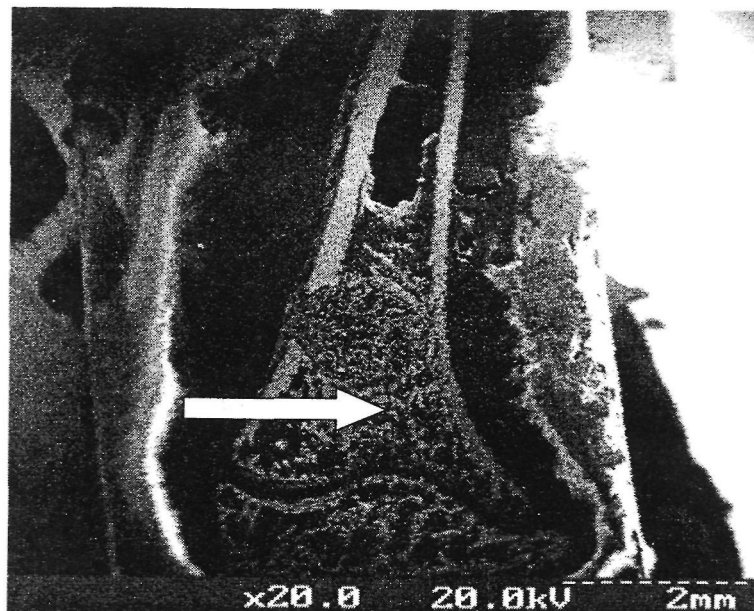


Рис. 4. Сканограма поверхні травмованої кістки через 10 днів після нанесення дефекту. Zoom 20. Стрілкою вказано місце дефекту, заповнене кістковими балочками, що формуються.

лізацію матриксу. Біля зони дефекту рівень кальцію та фосфору знижується в середньому на 12,42% ( $p < 0,05$ ) та 11,28% ( $p < 0,05$ ), Ca/P коефіцієнт залишається на рівні попереднього терміну. Показники вмісту макроелементів кісткової тканини віддалених ділянок залишаються незмінними.

Остеометрія досліджуваних кісток показала зростання передньо-заднього розміру діафізу та його ширини відповідно на 5,83% та 7,04%, що є показником розвитку періостальної реакції та не є патологічною ознакою. Всі інші розміри знаходяться нарівні неушкоджених кісток.

При мікроскопічному дослідженні на 15 добу зона дефекту щурів контрольної групи виповнена, в основному, фіброретикулярною тканиною (38,3±1,5%) з високою щільністю остеогенних клітин та грубоволокнистою кістковою тканиною (39,7±2,09%) (рис. 5). Остання формує великопетлясті кісткові трабекули що заповнюють зону дефекту. Трабекули вкриті остеобластами, щільність яких більша в метафізарному дефекті. Забарвлюються новоутворені трабекули менш інтенсивно ніж материнська кістка та нерівномірно, що свідчить про початок осифікації та її гетеротопічність. В міжтрабекулярних просторах формується жовтий кістковий мозок та судини. Звертає на себе увагу висока кількість ендотеліоцитів судин, що є свідченням інтенсивного васкулогенезу. Материнська кістка спаяна з молодими кістковими трабекулами з високою щільністю яскраво забарвлених остеобластів та остеоцитів. Кортикальна пластинка поблизу дефекту місцями не має остеоцитів. В трабекулах материнської кістки біля зони травматичного ушкодження виявляються безклітинні ділянки, базофільні цементні лінії. На їх поверхні визначаються новоутворені трабекули. З боку періосту спостерігаються осередки зрілої грануляційної тканини з поодинокими судинами (15,52±0,64%).

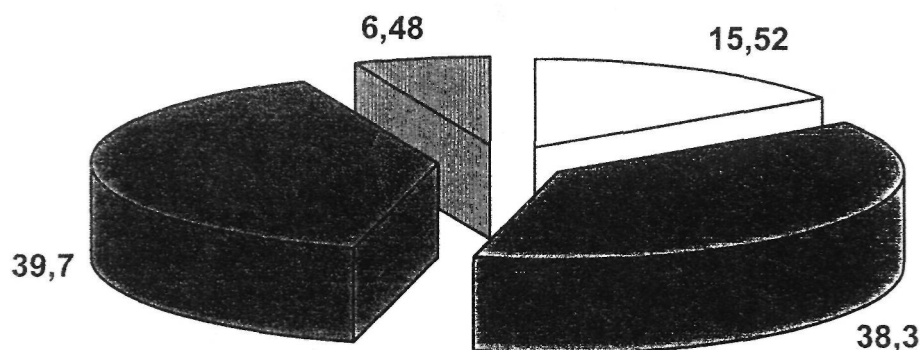
Загальний білок плазми крові в даний термін за-

лишається нижчим за попередні терміни і становить 5,16 г/л. Лужна фосфатаза через 15 днів після дефекту різко знижується до  $2800,81 \pm 34,76$  нмоль/с\*л і разом із збільшенням вмісту кальцію на 72,72% ( $2,28 \pm 0,03$  ммоль/л) свідчить про активацію остеогенезу в травмованій кістці.

Хімічний склад ділянки дефекту характеризується зростанням вмісту кальцію, до 26,61%, але концентрація його залишається меншою за аналогічний показник неушкодженої кістки. До рівню контролю знижується рівень цинку та магнію, концентрація марганцю та заліза залишається незмінною. Характерною рисою для даного терміну репаративного остеогенезу є зростання вмісту міді до 1,7 мг %/золу.

Остеометрія травмованих кісток показала зменшення довжини кістки в середньому на 5,68%, що вказує на уповільнення ростових процесів внаслідок травми. Поперечні розміри діафізу все ще перевищують дані неушкоджених кісток на 5,72% та 6,59%. Незмінними залишаються поперечні розміри проксимального та дистального епіфізів травмованих кісток.

На електроннограмах в місці дефекту візуалізуються кісткові трабекули з гомогенними масами поміж них. На новоутворених трабекулах добре виявляється кальцій та фосфор у концентраціях, що значно менші за такий же рівень у інтактної кістки. Така картина є характерною для початку інтенсивної осифікації органічного матриксу та добре корелює з гістологічною картиною та біохімічними показниками крові. Вміст кальцію та фосфору біля місця дефекту стрімко знижується, що можна пояснити використанням кісткового кальцію для побудови трабекул новоутвореної кістки. їхні концентрації складають  $15,254 \pm 0,12\%$  та  $6,992 \pm 0,05\%$ . На дефіцит кальцію вказує також зменшення кальцій-фосфорного коефіцієнта на 13,74% (до  $2,01 \pm 0,02$ ). На віддалених ділянках травмованої кістки в даний термін починає різко зменшуватись вміст остеогенних елементів, вказую-



□ грануляційна тканина    □ фіброретикулярна тканина    ■ грубоволокниста кісткова тканина    ■ червоний КМ

Рис. 5. Відсоткове відношення тканинного складу регенерату великогомілкової кістки через 10 днів після нанесення дефекту

чи на локальну реакцію неушкоджених ділянок та використання ендогенного кісткового кальцію в осифікації побудованого органічного матриксу. Вміст кальцію та фосфору на поверхні кістки зменшується відповідно до  $17,267 \pm 0,18$  в% та  $7,591 \pm 0,07$  в% (Рис. 6). Кальцій-фосфорний коефіцієнт зменшується на  $17,17\%$ -до  $1,93 \pm 0,03$ .

На 24 добу у тварин основна площа дефекту виконана мілкопетлястою сіткою грубоволокнистих трабекул з численними остеоцитами. Забарвлення балок більш рівномірне та наближається по інтенсивності до материнської кістки, що свідчить про норма-

лізацію осифікації остеоїда. На поверхні трабекул розташовується невелика кількість остеобластів, що свідчить про уповільнення процесу утворення нового матриксу. Кортикальна пластинка, в основному, відновлена за рахунок формування пластинчастої кісткової тканини та відрізняється від материнського кортексу більшою кількістю судинних та остеоцитарних лакун. Останні мають овальну форму, складаються з 3-5 концентричних пластинок та за характеристиками наближають до первинних (Рис. 7). На межі з материнською кісткою відмічаються лінії склеювання. Подекуди, між новоутвореними трабекулами, зу-

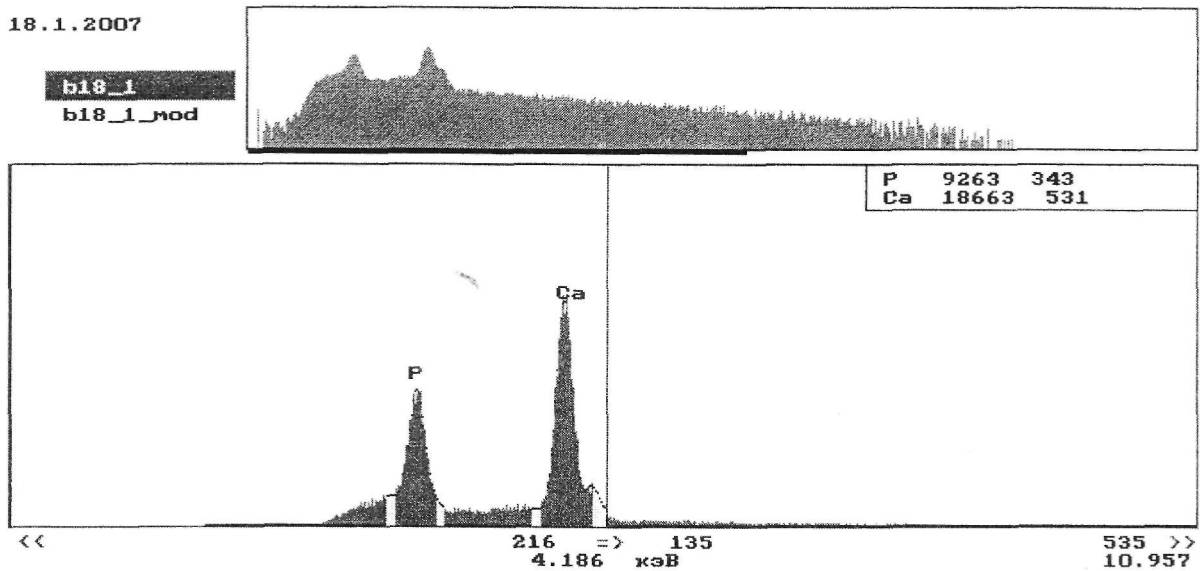


Рис. 6. Спектр з поверхні травмованої кістки через 15 днів після травми на віддалені від дефекту.

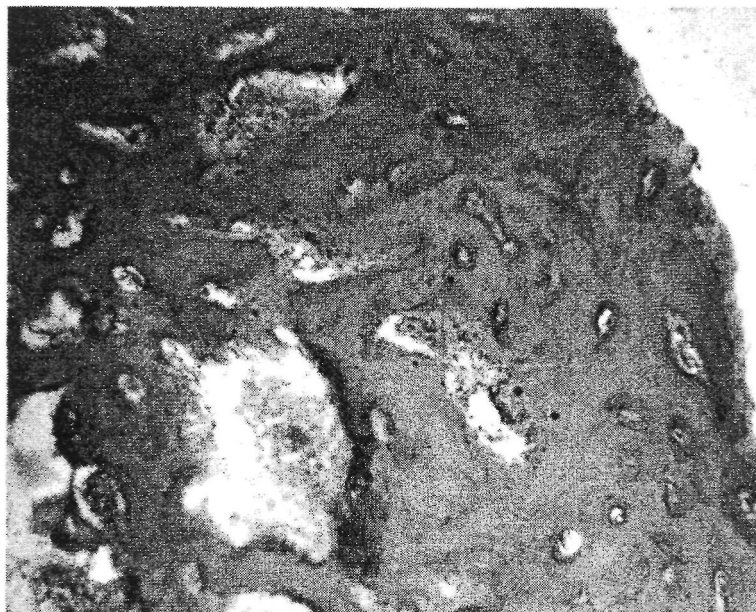


Рис. 7. Ділянка дефекту діяфізу великогомілкової кістки через 24 доби після нанесення дефекту. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoom X 400.

стрічаються ділянки остеогенної фіброретикулярної тканини та червоний кістковий мозок, зона кісткоутворення добре васкуляризована.

Морфометрія кісткової мозолі в даний термін спостереження свідчить про закінчення первинного формування новоутвореної кістки та початок процесу ремоделювання. З поля зору зовсім зникає грануляційна тканина що заповнювала порожнину дефекту та була основою для формування кісткових трабекул. Залишки фіброретикулярної тканини становлять  $11,3 \pm 0,36\%$ , зменшується вміст грубоволокнистої кісткової тканини до  $19,3 \pm 0,74\%$ . На той же час відсоток пластинчастої кісткової тканини становить  $39,2 \pm 2,15\%$ . Між трабекулами новоутвореної кістки вміст червоного кісткового мозку складає  $22,7 \pm 0,66\%$ .

Таким чином, через 24 доби після нанесення дефекту спостерігається трансформація кісткової мозолі з переважанням пластинчастої кісткової тканини. В подальшому за рахунок процесів ремоделювання буде відбуватися організація кісткової тканини та процеси подальшої мінералізації новоутвореного матриксу, що призведе до повного морфологічного та функціонального відновлення дефекту кістки.

В даний термін спостереження біохімічні показники крові свідчать про припинення утворення органічного матриксу, відсутність резорбції кісткової тканини та інтенсивні процеси кісткоутворення та ремоделювання регенерату. Так вміст білка майже приходить до норми та становить  $6,38 \pm 0,04\%$ , рівень лужної фосфатази менше від інтактних показників на  $22,4\%$ . Підвищеним залишається тільки рівень кальцію на  $125\%$ , що вказує на його мобілізацію і залучення для осифікації новоутвореного матриксу.

Хімічний склад травмованої кістки характеризується наближенням до контрольних показників концентрації майже всіх досліджуваних елементів. Меншим за показники неушкоджених кісток залишається вміст кальцію на  $5,71\%$ , що свідчить про недостатню кальцифікацію новоутвореного матриксу. Характерним для даного терміну репаративного остеогенезу є різке зростання рівню міді, концентрація якої складає  $6,6\text{ мг}\%$  золю, що майже в 7 разів перевищує показники неушкоджених кісток. Таке різке збільшення рівню міді можна пояснити її ключовою участю в процесах кальцифікації в якості коферменту.

Електроннограми, отримані на растровому електронному мікроскопі вказують на наявність низькомінералізованих кісткових трабекул губчастої речовини та пластинчастої тканини біля кортикального шару кістки. Поряд з дефектом та на відстані в 15 мм вміст основних кісткових елементів майже не змінюється в порівнянні з попереднім терміном спостереження, що також вказує на уповільнення мобілізації кальцію

та фосфору і взагалі процесів звапнення новоутвореного кісткового матриксу. Вміст кальцію в даних ділянках дорівнює відповідно  $7,129 \pm 0,09\%$  та  $12,283 \pm 0,16\%$  і фосфору  $3,201 \pm 0,06\%$  та  $5,575 \pm 0,04\%$ . На 24 добу після нанесення дефекту залишається відставання довжини кістки на  $5,29\%$  та перевищення ширини діафізу на  $5,49\%$ .

#### ВИСНОВКИ

Таким чином, механічна травма призводить до вираженої реакції кісткової системи та організму в цілому, що направлена на відновлення цілісності кісткової тканини. Характерним є стадійність репаративних процесів та специфічні зміни всіх досліджуваних показників для кожного терміну репаративного остеогенезу. Ці данні можна використовувати для аналізу процесу загоєння перелому та специфічної корекції дисрегенераторних змін.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Аболин А.Б., Щербак И.Г. Уровни организации минерального матрикса костной ткани и механизмы, определяющие параметры их формирования// Морфология. - 2005. - Т. 127, №2. - С. 78-82.
2. Денисов -Никольский Ю.И., Жилкин Б. А., Докторов А.А., Матвейчук И.В. Ультраструктурная организация минерального компонента пластинчатой костной ткани у людей зрелого и старческого возраста//Морфология.-2002.-Т. 122, вып. 5. - С. 79-83.
3. Корж Н.А., Дедух Н.В. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации// Ортопедия, травматология и протезирование. - 2006. - № 1. - С. 76-84.
4. Мажуга П.М. Особенности дифференцировки клеток в хондрогенезе и остеогенезе// Цитология и генетика. -1994. - Т.28., №1. - С. 9-15.
5. Benfu C, Xueming T. Ultrastructural investigation of experimental fracture healing. Electron microscopic observation of cellular activity// Chin. Med. J. - 1999. - Vol. 92, №8. -P. 530-535.
6. Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycleregulators/ Tanaka Y., Maruo A., Fujii K., Nomi M. et al// J. Bone Miner. Res.-2000.-Vol. 15(10).-P. 1912-1923.
7. Suzuki R., Domon T., Wakita M. Some osteocytes released from their lacunae are embedded again in the bone and not engulfed by osteoclasts during bone remodeling//Anat. Embryol. (Berl.)/ - 2000. - №2. - P. 121-128.
8. Webb J.C., Tricker J. A review of fracture healing/ / Current orthopedics. - 2000. - Vol. 14. - P. 457-463.