

УДК 616.718.5-007.2-003.93-085.27Кальцецин-092.9:599.323.4

Влияние препарата «Кальцецин» на регенерацию кости в эксперименте

Р. Р. Ходжаев, Г. А. Шерматов

НИИ травматологии и ортопедии МЗ Республики Узбекистан, Ташкент

The article describes results of experimental researches, which were conducted on 40 white laboratory rats at the age of 6 months. Bone regeneration was studied in a perforated transcortical defect, made in the proximal tibial metaphysis, under the effect of Calcemin drug. Unlike other agents, studied before, Calcemin produced a systemic effect on the bone tissue owing to the fact that besides calcium and phosphorus this drug contains microelements, which improve metabolism of normal bones and promote their regeneration. It was found out that Calcemin stimulated reparative osteogenesis and resulted in the formation of bone tissue within the shortest terms.

Представлено результати експериментальних досліджень, які проведені на 40 білих лабораторних щурах віком 6 міс. Вивчено регенерацію кістки у дірчастому транскортикальному дефекті, виконаному у проксимальному метафізі великогомілкової кістки, під впливом препарату «Кальцецин». Від раніше досліджених препаратів «Кальцецин» відрізняється системною дією на кісткову тканину завдяки вмістові у ньому не лише кальцію і фосфору, а й мікроелементів, які поліпшують метаболізм нормальної кістки та сприяють її регенерації. Встановлено, що «Кальцецин» стимулює репаративний остеогенез та призводить до формування кісткової тканини у найкоротші терміни.

Ключевые слова: регенерация кости, крысы, «Кальцецин»

Введение

В зарубежных странах наблюдается дефицит потребления кальция как взрослыми, так и детьми. Уровень суточного его потребления, необходимого для формирования пика костной массы у детей, составляет от 1000 до 1500 мг. Дефицит кальция в пище, ненормальное его всасывание в желудочно-кишечном тракте, усиленное выведение являются факторами риска развития нарушений формирования скелета [2, 6].

Доказано, что патогенетическим звеном ряда заболеваний (остеопороз, остеопения), а также сбоев репаративного остеогенеза может быть нарушение кальциевого гомеостаза в организме, в связи с чем в научной литературе предложено специальное определение «кальций-дефицитные» болезни [3, 8]. В костной ткани человека, особенно у детей на этапах роста и развития, при дефиците в организме кальция происходят выраженные изменения негативного характера [4]. Исследования, в которых бы раскрывались особенности репаративного остеогенеза под влиянием препарата «Каль-

цецин» и «Кальцецин адванс», сейчас единичны и не отражают многообразия морфологических проявлений, наблюдающихся в области травматического повреждения.

Цель исследования: изучить регенерацию кости в транскортикальном дырчатом дефекте в области проксимального метафиза большеберцовой кости при лечении животных препаратом «Кальцецин».

Материал и методы

Экспериментальные исследования проведены в двух сериях на 40 половозрелых 6-месячных крысах популяции экспериментально-биологической клиники ГУ «ИППС им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины» живой массой (345 ± 25) г при соблюдении правил гуманного отношения к экспериментальным животным [7]:

1 серия (контроль) — моделирование транскортикального дырчатого дефекта в области проксимального метафиза большеберцовой кости — 20 крыс;

2 серия (опыт) — моделирование такого же



Рис. 1. Фото формирования дефекта в проксимальном отделе большеберцовой кости крысы

дефекта и лечение животных «Кальцемином», начиная с 3-х суток после операции — 20 крыс.

Во время эксперимента животные находились под постоянным ветеринарным наблюдением и содержались на стандартном пищевом рационе.

Препарат «Кальцемин» в дозе 1,4 мг/кг животным вводили *per os* один раз в сутки утром в суспензии дистиллированной воды, начиная с 3-х суток после воспроизведения дефекта и на протяжении всего срока наблюдения.

Крысы были выведены из эксперимента через 5, 7, 14 и 30 суток после операции путем ингаляционной передозировки эфира для наркоза.

Техника оперативных вмешательств, моделирование дефекта

Моделирование дырчатых дефектов кости у животных выполняли под общим внутримышечным наркозом (аминазин — 10 мг/кг, кетамин — 50 мг/кг) в условиях асептики. Латеральным доступом выполняли разрез кожи в области проксимального метафиза большеберцовой кости. Тупым распатором раздвигали мышцы и стоматологическим бором (диаметр 2,5 мм) производили транскорткальный дефект (рис. 1) на глубину 2,5 мм, рану зашивали. Для морфологических исследований выделяли фрагменты костей крыс с дефектами, фиксировали их в 10 % растворе нейтрального формалина, декальцинировали в растворе 4 % азотной кислоты, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и заключали в целлоидин [5]. Гистологические срезы толщиной 7–9 мкм окрашивали железным гематоксилином Вейгерта и эозином, а также пикрофуксином по Ван-Гизон. Окрашенные срезы анализировали под микроскопом «Micros MC-50».

В работе использованы морфологические и морфометрические методы для оценки состояния кости и течения остеорепаративного процесса (анализ

тканей формирующегося регенерата и морфометрия площади новообразованной костной ткани в дефекте). Относительную площадь новообразованной костной ткани в дефекте (в процентах от его площади) определяли на центральных срезах, используя квадратно-сетчатую окулярную вставку (на площади 19 600 мкм²) по методике Г. Г. Автандилова [1], подсчитывая количество точек (пересечений квадратов), которые попадали на объект исследования.

Кроме того, в вышележащем сегменте оперированной конечности (дистальном метафизе бедренной кости) оценивали состояние костной ткани у крыс с лечением и без него. Для этого, используя квадратно-сетчатую окулярную вставку, на гистологических срезах (ув. 84) подсчитывали число точек, попадавших на костные трабекулы и межтрабекулярные пространства, после чего определяли коэффициент отношения их площадей. Подсчитывали также количество контактов костных трабекул с кортексом (в поле зрения микроскопа, ув. 40), начиная от эпифизарной ростовой пластинки в направлении диафиза.

Результаты и их обсуждение

5-е сутки после моделирования дефекта. При макроскопическом исследовании, проведенном после выведения животных из эксперимента, дефект у крыс обеих серий обнаруживался в виде небольшого углубления, заполненного рыхлой тканью.

При исследовании под световым микроскопом выявлено, что дефекты у животных обеих групп были заполнены участками кровяного сгустка с признаками реорганизации как в центральных, так и в краевых отделах. В центральных областях регенерата кровяной сгусток был неоднородным по структуре. Обнаружены скопления эритроцитов, среди которых преобладали распадающиеся, маркером чего служил гемосидерин. Нити фибрина формировали неупорядоченную сеть, среди которой располагались фибробласты. Выявлены единичные лимфоциты, нейтрофилы и макрофаги (рис. 2, а). По краю дефекта у животных контрольной группы отмечена молодая грануляционная и очаги фиброретикулярной тканей (рис. 3, а).

Отличительной особенностью регенератов у животных опытной группы была фиброретикулярная ткань остеогенного характера (рис. 2, б), которая прорастала из межтрабекулярных пространств материнской кости. Эта ткань состояла из лентовидных пролифератов фибробластов и остеобластов, плотность которых была высокой, особенно в краевых участках дефекта (рис. 3, б). Остеобласты располагались и вокруг формирующихся кровеносных

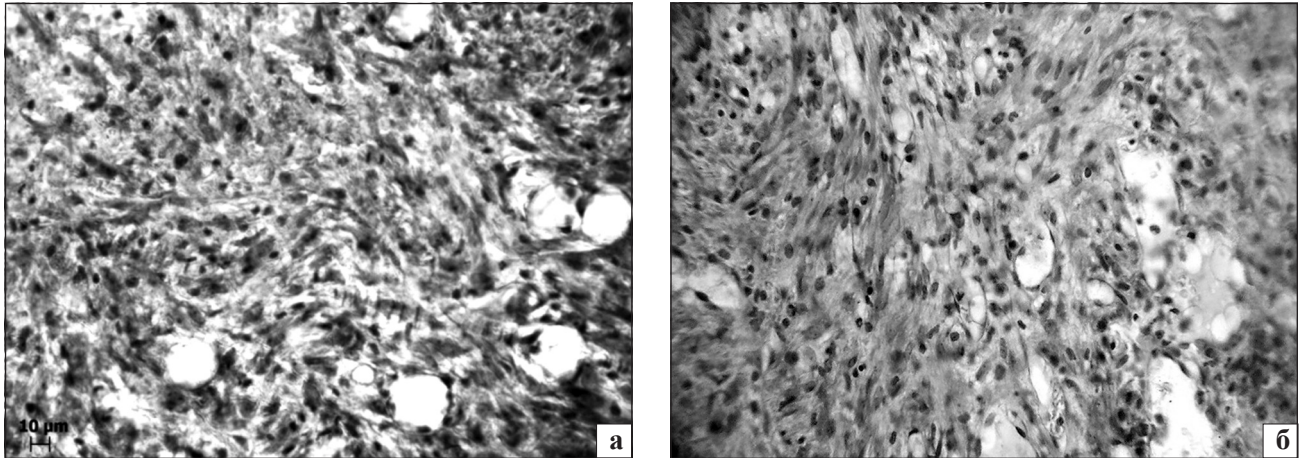


Рис. 2. Микрофото центральной области дефекта. Тяжи из фибробластов. Скопления остеобластов: а) контроль, б) опытная серия. Гематоксилин и эозин. Ув. 200

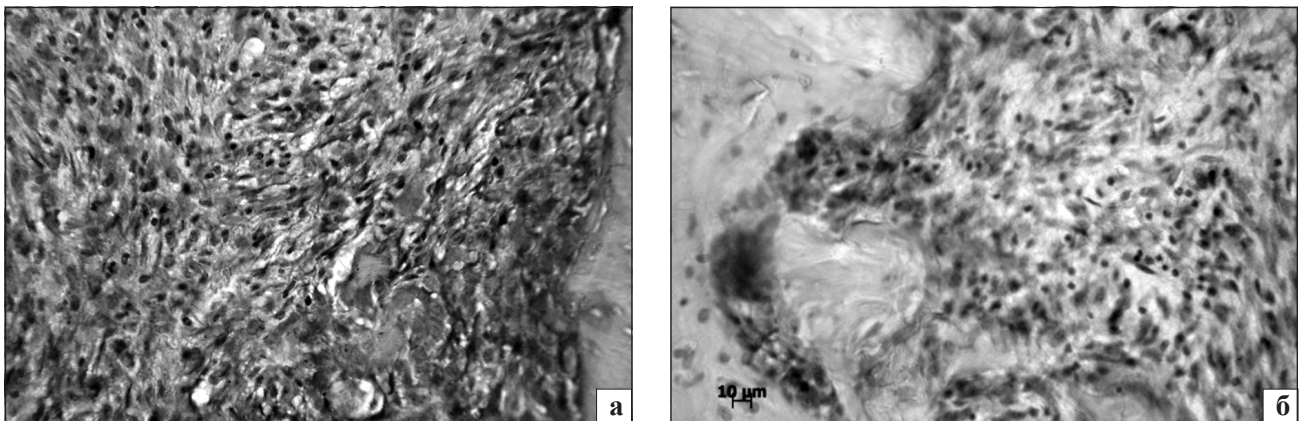


Рис. 3. Микрофото краевой зоны дефекта в области губчатой кости. Фиброретикулярная ткань остеобластического типа: а) контроль, б) опытная группа. Гематоксилин и эозин. Ув. 200

сосудов синусоидного типа, и по краю материнских костных трабекул, обращенных к дефекту.

Прилежащие к дефекту кортекс и костные трабекулы материнской кости были с признаками деструктивных нарушений (на отдельных участках отсутствовали остециты, матрикс был неоднородным), связанными с травматическим повреждением кровеносных сосудов, что приводит к ишемии костной ткани, дефициту питания остеоцитов и их гибели.

Периост над областью дефекта не сформирован. Над краевой поверхностью кортекса, прилежащего к дефекту, периост был отечным, пучки коллагеновых волокон разобщены, среди них находились единичные фибробласты с признаками некроза и лизиса.

7-е сутки. Макроскопических отличий в области дефекта у животных контрольной и опытной групп не выявлено. При микроскопическом исследовании сохранялись отличительные особенности в организации регенерата у животных опытной группы по сравнению с контрольными. Так, сформировавшиеся регенераты у опытных животных были представлены грануляционной тканью, располагающейся

на небольших территориях в центральных отделах дефекта, фиброретикулярную ткань, обширные территории которой выявлены в краевых отделах дефекта, а также грубоволокнистыми костными трабекулами (рис. 4, а).

Грануляционная ткань имела характерное строение. В ней преобладали фибробласты, обнаружены единичные лимфоциты и макрофаги. Сосуды капиллярного типа разного диаметра имели четко оформленную стенку. В фиброретикулярной ткани остеобластического типа наряду с отдельными фибробластами или их скоплениями располагались клетки остеобластического дифферона. Сосуды капиллярного типа были единичны. Грубоволокнистые костные трабекулы характеризовались высокой плотностью остеобластов по краю трабекул (рис. 4, а).

В отличие от опытной группы, у контрольных крыс в регенерате сохранялись большие участки грануляционной ткани с многочисленными кровеносными сосудами. В фиброретикулярной ткани преобладали фибробласты. Скопления остеобластов

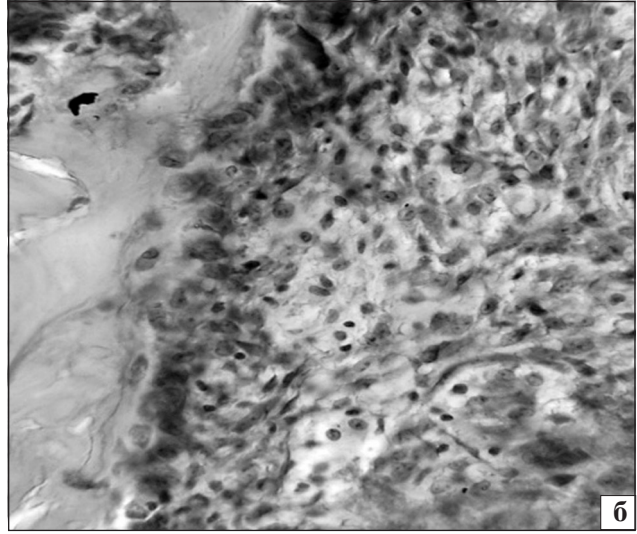
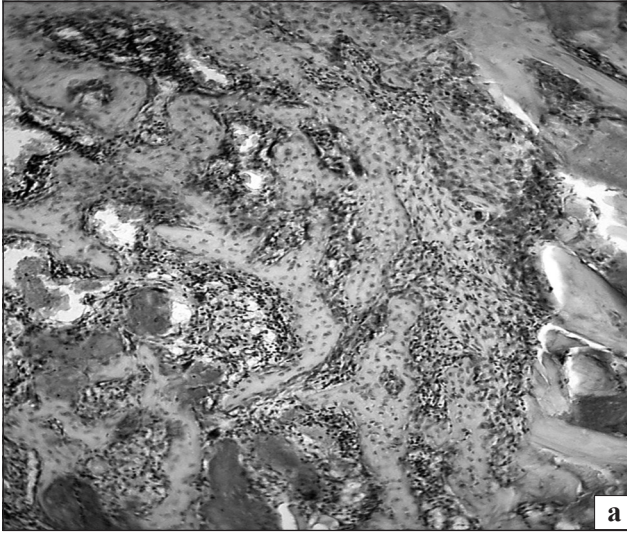


Рис. 4. Микрофото. Краевая область дефекта: а) опыт, новообразованные костные трабекулы по краю дефекта. Ув. 100, б) контроль, фиброретикулярная ткань с остеобластами по краю дефекта. Ув. 200. Гематоксилин и эозин

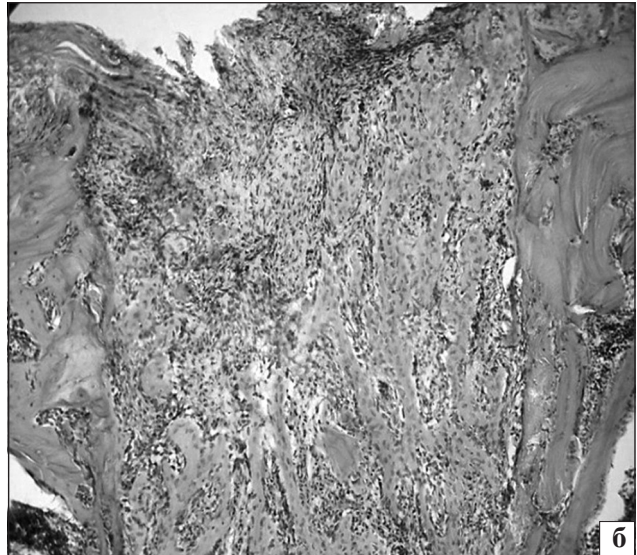


Рис. 5. Микрофото. Новообразованные костные трабекулы в дефектах животных. Фиброретикулярная ткань остеобластического типа в поверхностных отделах дефекта: а) опыт, б) контроль. Гематоксилин и эозин. Ув. 100.

(рис. 4, б) и единичные грубоволокнистые костные трабекулы находились в основном в области губчатой материнской кости. Отличительных особенностей в перестройке материнской кости, прилегающей к области дефекта, не выявлено. Формирования периоста над областью дефекта не зафиксировано ни у контрольных, ни у опытных животных.

14-е сутки. Макроскопически над областью травматического повреждения у контрольных и опытных животных определяли соединительнотканное уплотнение. Конечность в этой области была утолщена. При микроскопическом исследовании выявлено, что регенерат в дефекте опытных животных представлен костной тканью, состоящей из сети мелкопетлистых костных трабекул различной толщины.

Плотность остеоцитов на их поверхности была высокой. Клетки располагались в узких лакунах, имели гиперхромные ядра. По краевой поверхности костных трабекул обнаружены скопления остеобластов. Фиброретикулярная ткань остеобластического типа располагались лишь в поверхностных отделах регенерата (рис. 5, а).

В отличие от дефектов животных опытной группы, леченных препаратом «Кальцемин», в регенератах контрольных животных обнаруживали как новообразованные грубоволокнистые костные трабекулы, так и крупные поля фиброретикулярной ткани, в которой преобладали клетки фибробластического дифферона. У животных обеих серий перестройка материнской кости, прилегающей к дефекту, была

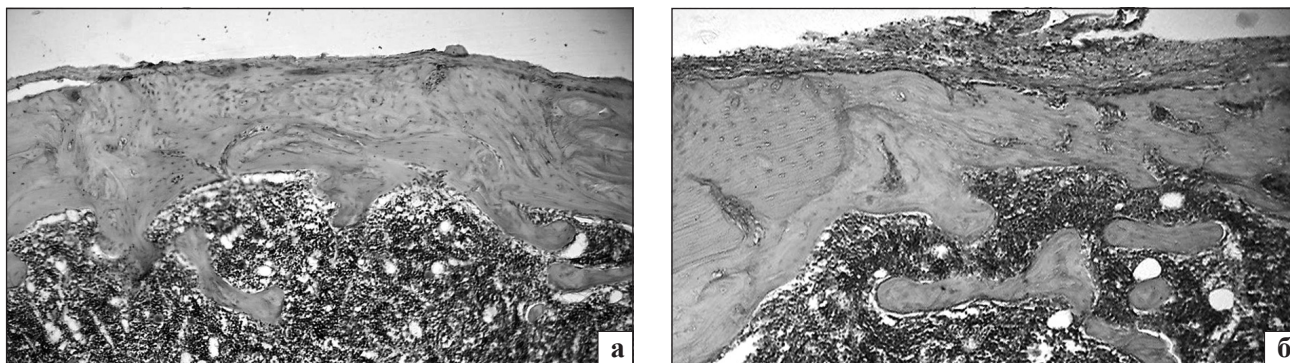


Рис. 6. Микрофото. Регенераты в области смоделированных дефектов: а) пластинчатая костная ткань, опыт, б) сеть костных трабекул в дефекте, контроль. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

относительно однотипной. Имела место реорганизация материнской кости за счет прорастания кровеносных сосудов и формирования новообразованной кости вокруг них. Над областью дефекта периост был сформирован в краевых отделах.

30-е сутки. Макроскопически в опытной и контрольной группах животных оперированная конечность была без признаков отека. При микроскопическом исследовании у животных, леченных препаратом «Кальцецин», выявлено, что область дефекта, располагавшегося в кортексе бедренной кости заполнена сформировавшейся костной тканью пластинчатого строения с небольшими резорбционными полостями и сосудистыми каналами с рыхлой соединительной тканью. Отмечен плотный контакт новообразованной костной ткани с краевыми отделами кортекса (рис. 6, а). В контрольной группе животных регенерат в области кортекса представлен костными трабекулами, формирующими мелкопетлистую сеть, вертикально расположенные трабекулы которой исходят из губчатой кости (рис. 6, б).

Для объективизации полученных данных морфологического исследования был выполнен *морфометрический анализ* костной ткани регенерата, результаты которого представлены в табл. 1.

На 7-е сутки после моделирования дефекта площади новообразованной костной ткани в регенератах животных опытной и контрольной групп не отлича-

лись. Однако при последующем исследовании (14-е и 30-е сутки) выявлены различия в территориях, занимаемых костной тканью в регенератах леченных «Кальцецином» животных, по сравнению с нелечеными. Так, на 14-е сутки в регенератах животных, получавших «Кальцецин», площади грубоволокнистых костных трабекул и пластинчатой костной ткани были выше в 1,2 и 3,85 раза соответственно по сравнению с контролем. На 30-е сутки площадь пластинчатой кости в регенерате у леченных животных была в 1,67 раза больше, чем у нелеченных, а территория грубоволокнистых костных трабекул уменьшилась в 2,74 раза. Полученные данные свидетельствуют о стимуляции репаративного остеогенеза в области травматического повреждения у животных, леченных «Кальцецином».

Известно, что травматическое повреждение приводит к развитию остеопенического синдрома в лежащих выше или ниже от области перелома сегментах конечности. В связи с этим были исследованы некоторые количественные показатели состояния губчатой кости в дистальном отделе бедренной кости у животных обеих групп как отражение системного воздействия «Кальцецина» на скелет (табл. 2). Показатели, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что у животных, получавших «Кальцецин», площадь костных трабекул была в 1,5 раза больше, чем в контроле. Это указывает на

Таблица 1. Относительный объем (%) новообразованной костной ткани в смоделированных костных дефектах крыс (n = 5)

Тип костной ткани	Группа животных	Относительный объем (%) костной ткани в разные сроки наблюдения		
		7-е сутки	14-е сутки	30-е сутки
Грубоволокнистая	Контроль	16,41 ± 1,82	34,75 ± 2,64	18,52 ± 1,95
	Опыт	19,79 ± 2,31 P* > 0,05	28,31 ± 2,26 P < 0,05	6,75 ± 0,84 P < 0,001
Пластинчатая	Контроль	Нет	3,24 ± 0,83	34,56 ± 2,98
	Опыт	Нет	12,49 ± 1,23 P < 0,001	57,87 ± 3,21 P < 0,001

Примечание. P* — достоверность отличий показателей опытных животных от контрольных

Таблица 2. Коэффициенты отношения площади костных трабекул к площади межтрабекулярных пространств губчатой кости в дистальном метафизе бедренной кости (n = 5)

Группа животных	Коэффициенты
Контроль	0,546 ± 0,09
Опыт	0,837 ± 0,07 P < 0,001

Таблица 3. Количество контактов костных трабекул губчатой кости с корковым слоем метафиза бедренной кости (n = 5)

Группа животных	Количество контактов
Контроль	6,15 ± 0,43
Опыт	8,67 ± 0,85 P < 0,05

утолщение костных трабекул и увеличение их площади, что приводит к укреплению костной ткани.

Важным показателем, отражающим влияние остеотропного препарата на костную ткань, является оценка интеграции костных трабекул губчатой кости с корковым слоем кости. Данные представлены в табл. 3. Как видно, показатель интеграции компактной и губчатой кости в группе леченных животных превышал аналогичный в контроле в 1,4 раза.

В результате проведенного экспериментального исследования выявлено, что при назначении препарата «Кальцецин», начиная с 3 суток (завершающая стадия воспалительного процесса) после моделирования дефекта, воспроизведенного в метафизарной области большеберцовой кости, на последующих сроках репаративного остеогенеза выражены отличительные особенности в формировании регенерата у животных двух групп. Так, у получавших «Кальцецин» на 7-е сутки исследования в области дефекта формируются ткани с повышенной плотностью клеток остеобластического дифферона, что отражает интенсивность костеобразования. Это может быть связано с влиянием основных составляющих препарата «Кальцецин», прежде всего витамина D₃ и целого набора микроэлементов, необходимых для метаболизма костной ткани. Витамин D — холекальциферол, входящий в состав препарата, способствует адекватному усвоению кальция, участвует в процессах регенерации и построения костной ткани. Роль цинка, входящего в состав препарата, многообразна, т. к. он необходим для биосинтеза нуклеиновых кислот, отвечающих за синтез и самосборку белков, а также активирующих дифференцировку остеобластов и биосинтез ими щелочной фосфатазы — одного из основных маркеров зрелых остеобластов. В связи с тем, что важным звеном формирования регенерата

является построение адекватной матрицы костной трабекулы, необходимо подчеркнуть роль гликозаминогликанов и коллагеновых белков, на биосинтез которых положительно влияет марганец. Входящий в состав препарата «Кальцецин» бор нормализует секрецию паратгормона — активатора резорбционных процессов в кости. По всей вероятности, ранний положительный ответ на препарат связан с его комплексным действием на формирующиеся структуры регенерата и зависит в значительной мере от адекватно подобранного состава. На 14-е сутки отличительные особенности между животными, лечеными «Кальцецином» и не получавшими препарат, сохраняются. Интенсификация образования в регенерате леченных животных костных структур связана с влиянием препарата на минерализацию кости, т. к. в его состав входит тропный к костной ткани кальций и витамин D, способствующий всасыванию кальция и дифференцировке остеобластов. Эта же тенденция сохраняется на более поздние сроки регенерации кости.

Выводы

Препарат «Кальцецин» положительно влияет на состояние костной ткани животных и оптимизирует репаративный остеогенез при моделировании дефекта. Полученные на животных данные могут быть экстраполированы на человека: назначать препарат необходимо после завершения стадии воспаления, учитывая его влияние на формирование костеобразующих структур регенерата на последующих этапах регенерации кости.

Список литературы

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. — М., Медицина, 1990. — 356 с.
2. Дедух Н. В. Значение кальция и витамина D₃ в метаболизме костной ткани / Н. В. Дедух // Проблемы остеологии. — 2002. — Т. 5, № 2–3. — С. 45–48.
3. Насонов Е. Л. Дефицит кальция и витамина D: новые факторы и гипотезы / Е. Л. Насонов // Остеопороз и остеопатии. — 1998. — № 3. — С. 42–47.
4. Поворознюк В. В. Кальцій та вітамін D у профілактиці та лікуванні остеопорозу / В. В. Поворознюк // Здоров'я України. — 2002. — № 8. — С. 5–8.
5. Саркисова Д. С. Микроскопическая техника: рук-во / Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — С. 544.
6. Умаров Ф. Х. Регенерация метадиафизарного перелома плечевой кости при лечении животных препаратом Кальций-D₃ Никомед / Ф. Х. Умаров // Украинский медицинский альманах. — 2010. — Т. 13, № 3. — С. 200–204.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasbourg, 1986. — P. 52.
8. Fujita T. Osteoporosis: past, present and future / T. Fujita // Osteoporosis Int. — 1997. — Suppl. 3. — S. 6–9.